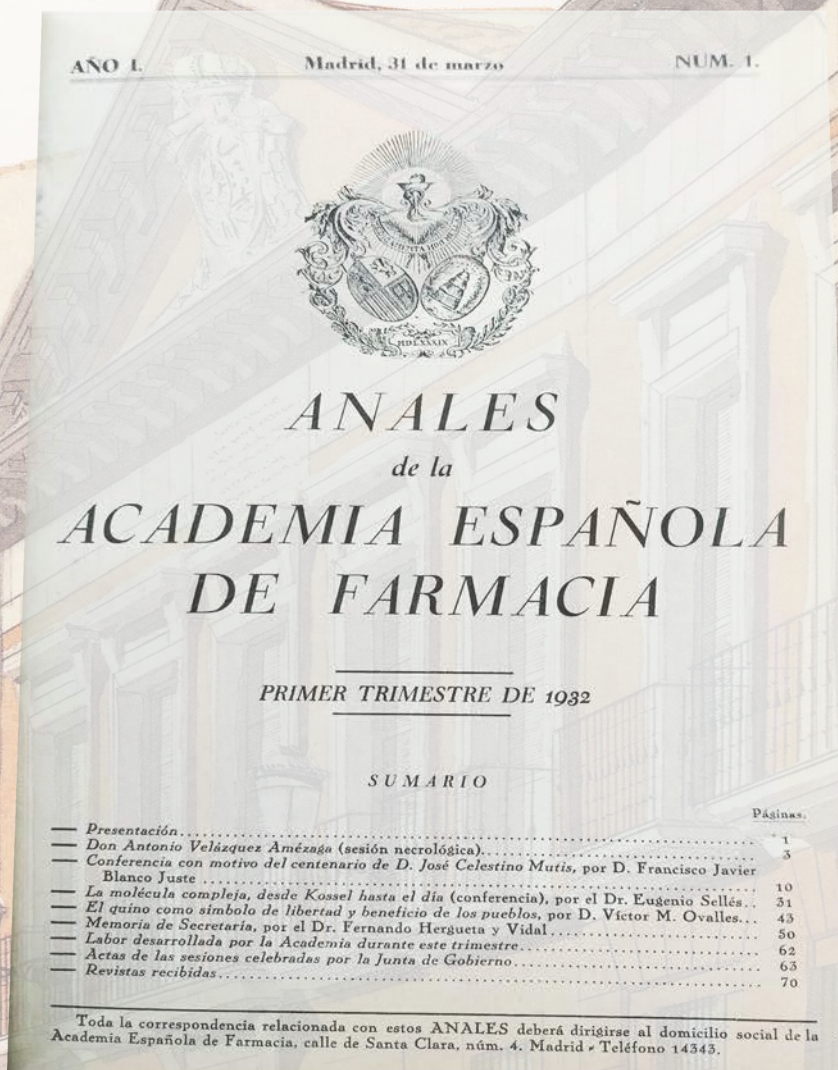




# 90 ANIVERSARIO 1932 - 2022



**ANALES  
DE LA  
REAL ACADEMIA  
NACIONAL DE FARMACIA**







## SUMARIO

Antonio L. DOADRIO VILLAREJO  
Editorial

### Sección 1 - Química y Física

Antonio L. DOADRIO VILLAREJO  
Los óxidos de nitrógeno y su importancia en la contaminación atmosférica

José ELGUERO, Carlos A. Martínez, Dionisia Sanz,  
Rosa M. Claramunt  
Reactividad de la curcumina y de las  $\beta$ -dicetonas curcuminoides con el *o*-aminotiofenol: síntesis de 1,5-benzotiazepinas

Fernando FERRÁNDIZ VINDEL  
Aplicación de la simulación de Montecarlo para la evaluación de riesgos en el desarrollo de un método analítico según los principios de la calidad por diseño (qbd)

Agustín GARCÍA ASUERO  
Nanometrología y nanoanalítica: una anotación

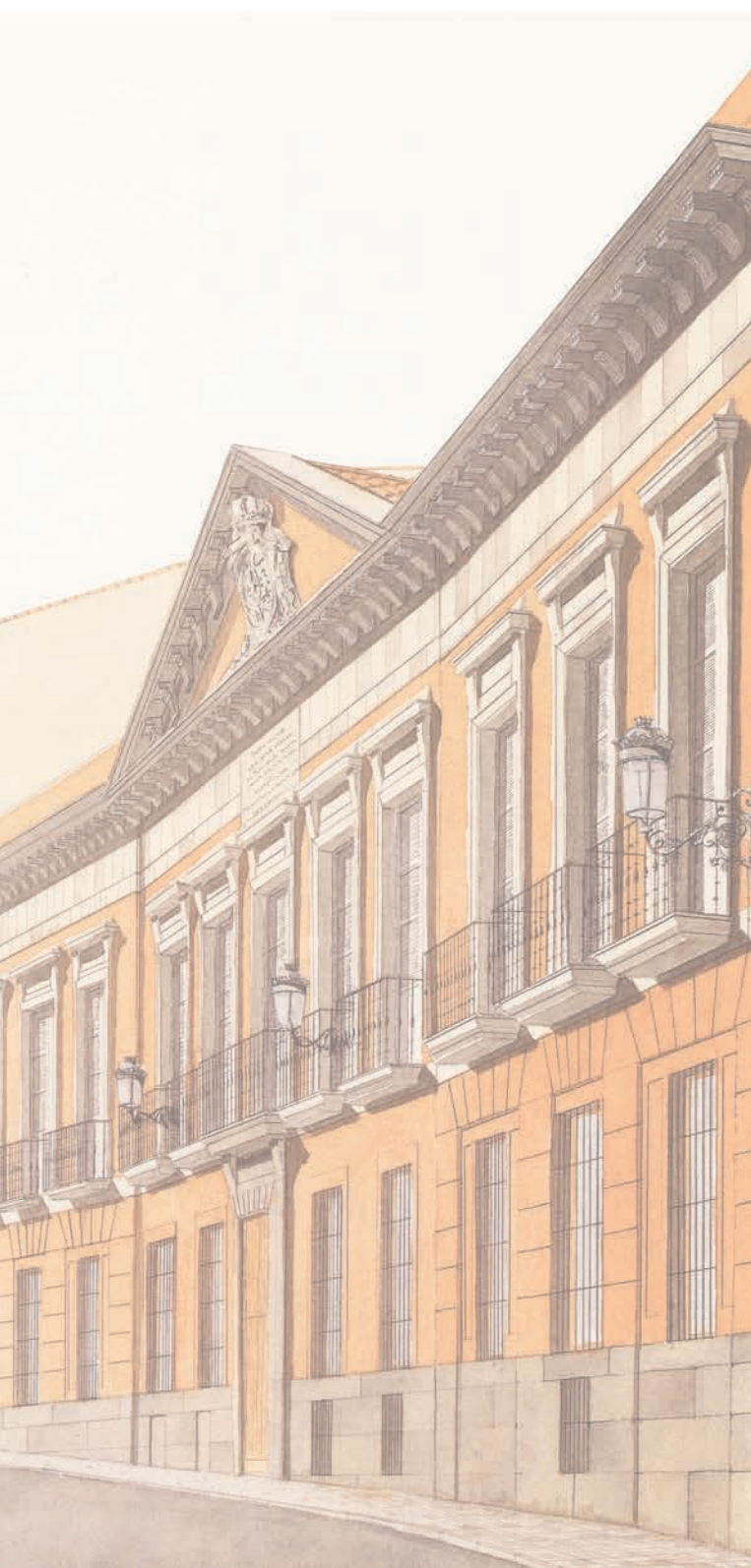
José Carlos MENÉNDEZ RAMOS  
Fármacos multidiana contra enfermedades neurodegenerativas

### Sección 2- Biología, Biotecnología y Farmacogenómica

Juan José BADIMON, Maeve Soto-Pérez y  
Juan Antonio Requena-Ibáñez  
Abordaje global del paciente cardiovascular de alto riesgo

José Antonio CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO  
Neuraminidasa / sialidasa del virus de la gripe: sus características, nomenclatura, medida de actividad, cinética, inhibidores agentes terapéuticos

Juan García Arriaza, Mariano Esteban  
La vacuna MVA-CoV2-S desarrollada en el CNB-CSIC es altamente inmunogénica y completamente eficaz frente al SARS-CoV-2/COVID-19: futuro y oportunidades





Federico MAYOR ZARAGOZA  
La libertad, el don supremo... de todos

José Miguel ORTIZ MELÓN  
Antiguos y nuevos paradigmas en Bioquímica y  
Biología molecular

Rafael SENTANDREU RAMÓN  
Introducción al humanismo y el transhumanismo anexo "agenda  
2030 de la ONU para el "desarrollo sostenible"

### **Sección 3- Tecnologías Farmacéuticas**

Ana Isabel Olives, María del Mar Caja, Felipe A. Bravo-Lambie,  
Fresia M. Silva-Sofrás, María Antonia MARTÍN  
Alternativas sostenibles en cromatografía de líquidos.  
Aplicaciones en la determinación de fármacos

Bartolomé RIBAS OZONAS, Alfonso DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ y  
José MARTÍNEZ LANAÓ  
Iniciación a la Farmacocinética desde la Real Academia Nacional  
de Farmacia: un ejemplo de colaboración académica

### **Sección 4- Farmacología y Farmacoterapia**

Albino GARCÍA SACRISTÁN  
Regulación del tracto urinario inferior:  
micción e incontinencia urinaria.

Tomas GIRBÉS JUAN, Damián Córdoba Díaz  
Proteínas inactivadoras de ribosomas: enzimas  
en busca de función biológica

M. Pilar GÓMEZ-SERRANILLOS CUADRADO  
Potencial antioxidante de líquenes y sus  
metabolitos secundarios

Beatriz de las HERAS POLO  
Terpenos: una nueva estrategia terapéutica en enfermedades  
inflamatorias mediadas por el inflammasoma NLRP3

Antonio RODRÍGUEZ ARTALEJO  
Adaptación de la médula adrenal al estrés:  
implicaciones fisiopatológicas

Mercedes SALAICES SÁNCHEZ  
Integración de la investigación con la docencia.  
Experiencia de un Departamento universitario

### **Sección 5- Salud Pública, Alimentación y Medio Ambiente**

Iciar ASTIASARÁN y Diana Ansorena  
Proteínas vegetales: fuente alternativa a las proteínas animales

Montaña CÁMARA HURTADO,

M<sup>a</sup> Victoria Castillo Ruiz-Cabello y Elena Cebadera Miranda  
El sector agroalimentario español dentro  
de un mundo globalizado

Juan García-Bernalt Diego, Raúl Manzano-Román  
y Antonio MUÑOZ  
Vacunas y enfermedades olvidadas  
¿un reto complicado o una esperanza postpandemia?

José Antonio RODRÍGUEZ MONTES  
Importancia de la cirugía experimental para la formación del  
cirujano y desarrollo de la cirugía clínica

Roberto Medina Santillán, Ángel García Quismondo y  
Francisco José SÁNCHEZ MUNIZ  
Algunas consideraciones sobre la insulina cien años después de  
su descubrimiento

Francisco José SÁNCHEZ-MUNIZ, Adrián Macho-González,  
Sara Bastida, Alba Garcimartín, Arancha Bocanegra,  
Miguel Vázquez-Velasco, Laura González-Torres,  
Rocío Redondo Castillejo, Marina Hernández Martín,  
María Elvira López-Oliva Muñoz, Jorge Arturo Santos, Juana Benedi.  
Productos cárnicos saludables y funcionales.  
Evidencia científica del Grupo AFUSAN

### **Sección 6- Historia, Legislación y Bioética**

Rosa M. BASANTE POL  
Mujeres en la Academia: los inicios de la presencia femenina en  
nuestra Corporación

José Ángel Barberá Sáez, Santiago CUÉLLAR RODRÍGUEZ  
La Facultad de Farmacia, la Universidad Complutense de Madrid  
y la Transición política española

Emili ESTEVE SALA  
La disponibilidad de medicamentos en España

Antonio GONZÁLEZ BUENO  
La Congregación y Colegio de Boticarios del Señor San Lucas y  
Nuestra Señora de la Purificación de Madrid (1654-1675): la  
'microhistoria' de una organización devocional y profesional

Cecilio José VENEGAS FITO, Raquel C. Cueli Trelle  
y Antonio Ramos Carrillo  
Las boticas del mar.  
Inventarios de expediciones marítimas de la Corona española



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

DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.

---



**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*

*Rodríguez-Boto, Gregorio*

*Salinas Sánchez, Jesús*

Académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia

**Coordinación**

**Edición online 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<sup>a</sup>*

*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*

*Manzanares Robles, Jorge*

*Gómez-Serranillos Cuadrado, M<sup>a</sup> Pilar*

*González Bueno, Antonio I.*

*Molina Martín, María*

*Martínez Lanao, José*

*Daniel de la Cruz Sánchez Mata*

*Tomás Girbes Juan*

**Comité Científico Internacional**

*Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)*

*Prof. Lucette Bardet (Francia)*

*Kazuhiro Imai (Japón)*

*Vicenzo Tortorella (Italia)*

*Bernard Portha (Francia)*

*Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)*

*Herbert Zimmermann (Alemania)*

*Adolfo Pérez Miravete (Méjico)*

*Carl - Göran Eden (Suecia)*





# ÍNDICE

## pp. 343-344

Antonio L. DOADRIO VILLAREJO

Nonagésimo Aniversario de los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia

## pp. 345-350

Antonio L. DOADRIO VILLAREJO

Los óxidos de nitrógeno y su importancia en la contaminación atmosférica

## pp. 351-367

José ELGUERO, Carlos A. Martínez, Dionisia Sanz y Rosa M. Claramunt.

Reactividad de la curcumina y de las  $\beta$ -dicetonas curcuminoides con el *o*-aminotiofenol: síntesis de 1,5-benzotiazepinas.

## pp. 369-375

Fernando FERRÁNDIZ VINDEL

Aplicación de la simulación de Montecarlo para la evaluación de riesgos en el desarrollo de un método analítico según los principios de la calidad por diseño (qbd)

## pp. 377-386

Agustín GARCÍA ASUERO

Nanometrología y nanoanalítica: una anotación

## pp. 387-399

José Carlos MENÉNDEZ RAMOS

Fármacos multidiana contra enfermedades neurodegenerativas

## pp. 401-408

Juan José BADIMON, Maeve Soto-Pérez y Juan Antonio Requena-Ibáñez

Abordaje global del paciente cardiovascular de alto riesgo

## pp. 409-414

José Antonio CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO

Neuraminidasa / sialidasa del virus de la gripe: sus características, nomenclatura, medida de actividad, cinética, inhibidores agentes terapéuticos

## pp.415-426

Juan García Arriaza y Mariano Esteban

La vacuna MVA-CoV2-S desarrollada en el CNB-CSIC es altamente inmunogénica y completamente eficaz frente al SARS-CoV-2/COVID-19: futuro y oportunidades

## pp. 427-429

Federico MAYOR ZARAGOZA

La libertad, el don supremo... de todos.

## pp. 431-436

José Miguel ORTIZ MELÓN

Antiguos y nuevos paradigmas en Bioquímica y Biología molecular.

## pp. 437-444

Rafael SENTANDREU RAMÓN

Introducción al humanismo y el transhumanismo anexo "agenda 2030 de la ONU para el "desarrollo sostenible"

## pp. 445-453

Ana Isabel Olives, María del Mar Caja, Felipe A. Bravo-Lambie, Fresia M. Silva-Sofrás, María Antonia MARTÍN

Alternativas sostenibles en cromatografía de líquidos. Aplicaciones en la determinación de fármacos

## pp. 455-468

Bartolomé RIBAS OZONAS, Alfonso DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ y José MARTÍNEZ LANAÓ

Iniciación a la Farmacocinética desde la Real Academia Nacional de Farmacia: un ejemplo de colaboración académica.

## pp. 469-476

Albino GARCÍA SACRISTÁN

Regulación del tracto urinario inferior: micción e incontinencia urinaria.



**pp. 477-487**

Tomas GIBBES JUAN , Damián Córdoba Díaz

Proteínas inactivadoras de ribosomas: enzimas en busca de función biológica

**pp. 489-499**

M. Pilar GÓMEZ-SERRANILLOS CUADRADO

Potencial antioxidante de líquenes y sus metabolitos secundarios

**pp. 501-512**

Beatriz de las HERAS POLO

Terpenos: una nueva estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias mediadas por el inflamasoma NLRP3

**pp. 513-527**

Antonio RODRÍGUEZ ARTALEJO

Adaptación de la médula adrenal al estrés: implicaciones fisiopatológicas

**pp. 529-542**

Mercedes SALAICES SÁNCHEZ

Integración de la investigación con la docencia. Experiencia de un Departamento universitario

**pp. 543-554**

Iciar ASTIASARÁN y Diana Ansorena

Proteínas vegetales: fuente alternativa a las proteínas animales

**pp. 555-563**

Montaña CAMARA HURTADO

El sector agroalimentario español dentro de un mundo globalizado

**pp. 565-577**

Juan García-Bernalt Diego, Raúl Manzano-Román, Antonio MURO

Vacunas y enfermedades olvidadas ¿un reto complicado o una esperanza postpandemia?

**pp. 579-583**

José Antonio RODRÍGUEZ MONTES

Importancia de la cirugía experimental para la formación del cirujano y desarrollo de la cirugía clínica

**pp. 585-601**

Roberto Medina Santillán, Ángel García Quismondo, Francisco José SÁNCHEZ MUNIZ

Algunas consideraciones sobre la insulina cien años después de su descubrimiento

**pp. 603-626**

Francisco José SÁNCHEZ-MUNIZ, Adrián Macho-González, Sara Bastida, Alba Garcimartín, Arancha Bocanegra, Miguel Vázquez-Velasco, Laura González-Torres, Rocío Redondo Castillejo, Marina Hernández Martín, María Elvira López-Oliva Muñoz, Jorge Arturo Santos, Juana Benedi.

Productos cárnicos saludables y funcionales. Evidencia científica del Grupo AFUSAN

**pp. 627-646**

Rosa BASANTE POL

Mujeres en la Academia: los inicios de la presencia femenina en nuestra Corporación

**pp. 647-666**

José Angel Barberá Sáez, Santiago CUÉLLAR RODRÍGUEZ

La Facultad de Farmacia, la Universidad Complutense de Madrid y la Transición política española

**pp. 667-674**

Emili ESTEVE SALA

La disponibilidad de medicamentos en España

**pp. 675-692**

Antonio GONZÁLEZ BUENO

La Congregación y Colegio de Boticarios del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación de Madrid (1654-1675): la 'microhistoria' de una organización devocional y profesional

**pp. 693-701**

Cecilio José VENEGAS FITO, Raquel C. Cueli Trelle y Antonio Ramos Carrillo

Las boticas del mar. Inventarios de expediciones marítimas de la Corona española




## NONAGÉSIMO ANIVERSARIO DE LOS ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

## NINETIETH ANNIVERSARY OF THE ANNALS OF THE ROYAL NATIONAL ACADEMY OF PHARMACY OF SPAIN

**Antonio Luis Doadrio Villarejo**

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

### EDITORIAL

AÑO I.	Madrid, 31 de marzo	NUM. 1.
		
ANALES de la ACADEMIA ESPAÑOLA DE FARMACIA		
PRIMER TRIMESTRE DE 1932		
SUMARIO		
		Páginas.
—	Presentación.....	1
—	Don Antonio Velázquez Amézaga (sesión necrológica).....	3
—	Conferencia con motivo del centenario de D. José Celestino Mutis, por D. Francisco Javier Blanco Juste .....	10
—	La molécula compleja, desde Kossel hasta el día (conferencia), por el Dr. Eugenio Sellés... ..	31
—	El quino como símbolo de libertad y beneficio de los pueblos, por D. Víctor M. Ovalles... ..	43
—	Memoria de Secretaría, por el Dr. Fernando Hergueta y Vidal.....	50
—	Labor desarrollada por la Academia durante este trimestre.....	62
—	Actas de las sesiones celebradas por la Junta de Gobierno.....	63
—	Revistas recibidas.....	70

Toda la correspondencia relacionada con estos ANALES deberá dirigirse al domicilio social de la Academia Española de Farmacia, calle de Santa Clara, núm. 4. Madrid • Teléfono 14343.



Al celebrar este nonagésimo aniversario de nuestros Anales, debemos recordar el camino recorrido y trazar su futuro, con amplitud de miras, ilusión y ambición, buscando la calidad científica en el contenido de nuestra publicación, atrayendo a la mayor cantidad de científicos relevantes posibles.

El 31 de marzo de 1932 nace el primer número con la designación de Anales de la Academia Española de Farmacia, tal como se denominó a nuestra Institución cuando fue creada por el gobierno de la II República Española, aunque debido a las protestas de la Academia Española, el gobierno decide cambiar el nombre de la Academia Española de Farmacia por el de Academia Nacional de Farmacia, por lo que a partir del número 2, la publicación pasa a denominarse Anales de la Academia Nacional de Farmacia. En 1940, adquiere nuestra Institución el nombre de Real Academia de Farmacia y, consecuentemente, los Anales toman también ese título, para llamarse Anales de la Real Academia de Farmacia, lo que se mantiene hasta el número 1 de 2002, ya que a partir del número 2 de ese año, adquiere su actual nombre de Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, a consecuencia de la nueva denominación de nuestra Academia al entrar en vigor el nuevo Estatuto de 19 de abril de 2002.

La periodicidad de los Anales hasta 1935 fue trimestral. En 1936 y como consecuencia de la Guerra Civil, solo se publicó un número, quedando suspendida hasta 1940. De 1940 hasta 1942 siguió siendo una publicación trimestral, para pasar a bimestral de 1943 a 1966, por tanto, con seis números al año y a partir de 1967 volvió a ser trimestral, periodicidad que se ha mantenido hasta la fecha. Es de destacar, que desde 1977 se han publicado números extraordinarios de los trabajos realizados en los balnearios españoles por la Comisión de aguas minerales y mineromedicinales de nuestra Academia, siendo el primero el de Ledesma.

En total, se han publicado 88 volúmenes de nuestros Anales, siendo el número 3 de ese volumen, el más reciente. El número total de artículos publicados asciende a 2.474, todos ellos catalogados en nuestra Biblioteca Virtual.

Durante estos últimos años, se ha realizado un enorme esfuerzo para digitalizar los Anales, estando ya disponible la digitalización para su descarga en PDF desde 1932 a 1950; a partir de 1954 algunos años sueltos y a partir del año 2000 todos los números.

También, nos ha preocupado y hemos prestado mucha atención a la calidad científica de nuestra publicación y a su difusión. Actualmente y desde el año 2000, los Anales son Open Access, con una moderna web que permite a los autores el envío ágil y rápido de sus trabajos; está revisada por pares e indexada en Dialnet, Índices CSIC, Ibecs y Latindex.

El futuro no está escrito, pero sí nuestras intenciones de que siga creciendo esta publicación. Tenemos el proyecto de terminar de digitalizar los números restantes de 1954 a 1999, ampliar la indexación a otros organismos, como el PubMed y conseguir el mayor índice de impacto que podamos.

Con nuestro espíritu de superación, la ayuda del Gobierno de España, que nos financia, bien a través del Ministerio de Ciencia e innovación, el Ministerio de Cultura y Deporte y el apoyo del Instituto de España, al que pertenecemos como miembros de pleno derecho, conseguiremos llevar a nuestros Anales a su centenario a mayores metas.

Feliz Aniversario.

Antonio L. Doadrio.  
Presidente.



# LOS ÓXIDOS DE NITRÓGENO Y SU IMPORTANCIA EN LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

## NITROGEN OXIDES AND THEIR ROLE IN AIR POLLUTION

**Antonio L. Doadrio Villarejo**

Presidente y académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** antonioiv@ucm.es

### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

#### RESUMEN

Los óxidos de nitrógeno, monóxido y dióxido, denominados en la química ambiental como NO<sub>x</sub>, son gases contaminantes atmosféricos tóxicos de gran trascendencia para la salud. De esta manera, resulta preciso: a) su estudio estructural y el de sus propiedades, b) su control medio ambiental, sobre todo el de origen antropogénico y c) su relación entre concentración medioambiental y salud. En este trabajo, se aborda el estudio de la estructura molecular y propiedades relevantes de los NO<sub>x</sub> utilizando, esencialmente, herramientas de modelado molecular realizadas mediante el programa Spartan® 16.

#### ABSTRACT

*Nitrogen oxides (monoxide and dioxide) known in environmental chemistry as NO<sub>x</sub> are toxic atmospheric polluting gases of great importance for health. In this way, is necessary for NO<sub>x</sub>: a) structural study and properties, b) environmental control, in particular anthropogenic origin, c) relationship between environmental concentration and health. In this paper, molecular structure and significant properties of NO<sub>x</sub> is addressed, using molecular modeling tools carried out Spartan® 16 software.*

#### Palabras Clave:

óxidos de nitrógeno  
NO<sub>x</sub>  
contaminación  
modelado molecular

#### Keywords:

nitrogen oxides  
NO<sub>x</sub>  
pollution  
molecular models



## 1. INTRODUCCIÓN

El monóxido de nitrógeno, óxido de nitrógeno (II) u óxido nítrico (NO), es un gas incoloro, paramagnético, muy reactivo y que está presente en los mamíferos, donde realiza funciones de mensajero neuronal. Sin embargo, en concentraciones elevadas, se comporta como un tóxico, reduciendo la capacidad de transporte de la hemoglobina y mioglobina, irrita los ojos, garganta y vías respiratorias superiores y, en niveles muy altos, puede producir quemaduras de leves a graves, esencialmente en las vías respiratorias (1,2). Por su parte, el óxido de nitrógeno (IV) o dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), es un gas color fruto de café (tonalidad rojiza) y también es, como el anterior, paramagnético y de elevada reactividad. Como tóxico, se comporta en el ser humano, produciendo quemaduras, enfisema, sensación de ahogo, irritación de ojos, garganta y nariz, cansancio y náuseas (3).

Los NO<sub>x</sub> son contaminantes primarios, que pueden ser emitidos tanto por fuentes naturales, como antropogénicas (4). Las fuentes naturales más importantes son los gases emitidos por las bacterias generadoras de nitrógeno, en los incendios forestales y por el vulcanismo.

Las fuentes antropogénicas, por su parte, se refieren a los escapes de los vehículos a motor, la quema de combustibles fósiles y los abonos nitrogenados.

Los NO<sub>x</sub>, tienen una serie de características comunes, son moléculas paramagnéticas, como hemos reseñado anteriormente, lo que les hace comportarse como radicales libres, aunque no lo son, pero tienen una alta reactividad propia de aquellos.

Como contaminantes primarios atmosféricos, presentan problemas de salud pública "*per se*", como hemos indicado, pero también intervienen activamente en procesos de contaminación secundaria, como la destrucción de ozono en el denominado "agujero de ozono" a nivel estratosférico, formación de ozono troposférico o en la llamada lluvia ácida.

El objetivo de este trabajo es el de responder, utilizando las herramientas de modelado molecular, a preguntas que nos hemos hecho en química inorgánica respecto a los NO<sub>x</sub>. Para el NO, estas son: ¿El orden de enlace es de 2 o 2,5? ¿Qué potencial electrostático tiene la molécula? Para el NO<sub>2</sub>, lo son: ¿El ángulo de enlace es de 135°? ¿Qué potencial electrostático tiene la molécula?

¿Dónde se sitúa la nube electrónica del electrón no apareado? (5-7). Todo ello, es importante para comprender el mecanismo de actuación de los NO<sub>x</sub> en su contribución a la contaminación atmosférica.

El modelado molecular, también sirve para obtener las principales propiedades de las moléculas estudiadas, lo que contribuye a entender cómo se comportan estos óxidos y validar el modelo informático.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha empleado el programa de modelado molecular Spartan® 16, Wavefunction, INC., para la obtención de las imágenes y propiedades de los NO<sub>x</sub> mostradas en este trabajo. Hemos utilizado dos metodologías de ese programa, Austin Model 1 (AM1) que es un método cuántico semiempírico, donde se usa el hamiltoniano y la función de onda, incluye parámetros para los átomos de nitrógeno y oxígeno, pero no se incluyen a los electrones internos y Møller Plesset (MP2/6-31G\*\*), método *ab initio*, más preciso que el anterior, que tiene en cuenta los efectos de correlación de electrones y es una aproximación de la ecuación de onda. Los dos modelos de NO<sub>x</sub>, se han validado enfrentando los valores obtenidos en los cálculos termodinámicos por modelado molecular con los de la bibliografía; en este caso, consultando el CRC *Handbook of Chemistry and Physics* (8).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Modelado molecular

Los resultados obtenidos en la validación de los modelos NO<sub>x</sub>, se muestran en la Tabla 1. Se observan en ella, resultados similares con respecto a los esperados en la bibliografía, por lo que consideramos el modelo "*in silico*" válido.

A partir de esa premisa, vamos a responder a las preguntas expuestas anteriormente empleando el método MP2/6-31G\*\* "*in silico*". Para el NO, la primera es sobre su orden de enlace. Se discute si éste es 2 o 2,5. La química clásica, considera que el orden es de 2,5 utilizando la clásica fórmula: número de electrones enlazantes menos el de antienlazantes y dividiendo el resultado entre 2.

Tabla 1. Valores termodinámicos de los NO<sub>x</sub> (modelo AM1) a 298,15 K. Validación del modelo.

Valores termodinámicos	NO AM1	NO bibliografía	NO <sub>2</sub> AM1	NO <sub>2</sub> bibliografía
S° J/mol°	200	210.6	236.8	240.1
ΔH° kJ/mol	89.2	90.4	33.6	33.2
ΔG° kJ/mol	105	103.6	47.9	51.3

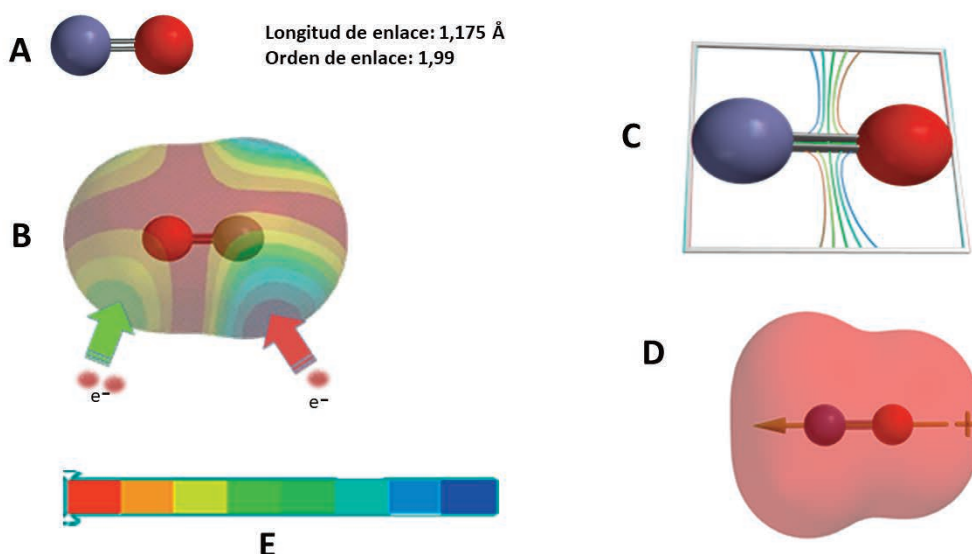


Figura 1. Modelo "in silico" del NO (Møller Plesset MP2/6-31G\*\*). A) Estructura molecular y cálculo de la longitud y orden de enlace: rojo oxígeno, azul nitrógeno. B) Mapa de densidad electrónica de espín. C) Mapa de densidad electrónica de enlace. D) Mapa de potencial electrostático. E) Leyenda de los mapas B y D: rojo carga electrostática negativa, azul positivo.

En nuestra opinión, eso sería correcto si el electrón desapareado contribuyese al enlace químico. Pero, como queda demostrado en el modelo "in silico", no es así (Figura 1).

Los resultados obtenidos "in silico", nos muestran una longitud de enlace de 1,175 Å (figura 1A), que se corresponde con un doble enlace nitrógeno-oxígeno, cuyo valor medio es de 1,15 Å, mientras que el orden de enlace es de 1,99 que corresponde a un doble enlace. La densidad electrónica de los dos electrones del enlace se sitúa en la zona verde (figura 1B) que corresponde al oxígeno. Por su parte, la figura 1C, nos muestra la formación de enlaces covalentes entre los dos átomos. La figura 1B, nos muestra una zona azul correspondiente al electrón desapareado que se sitúa sobre el nitrógeno, lo que se refuerza con el mapa electrostático de la figura 1D, donde se puede observar que el vector del momento dipolar se dirige hacia el nitrógeno y no hacia el oxígeno como sería lo esperado por ser más electronegativo que el nitrógeno, por lo que el momento orbital que genera el electrón desapareado sobre el nitrógeno debe tener una mayor contribución al momento total que los del enlace y orbital del oxígeno.

En lo que respecta al potencial electrostático, según apreciamos en la figura 1D, es esencialmente negativo.

El NO<sub>2</sub>, por su parte, presenta un orden de enlace de 1,67 (figura 2A), lo que le sitúa entre un enlace sencillo y uno doble, lo que es típico de formas resonantes. La longitud de los dos enlaces nitrógeno-oxígeno, es idéntica y de 1,22 Å, superior a un doble enlace medio N-O (1,15 Å), pero inferior a un enlace sencillo (1,36 Å), compatible con una forma resonante ONO, cuyo valor medio se estima en 1,23 Å.

Se ha estimado que el ángulo de enlace O-N-O sería de 135°. Sin embargo, el cálculo "in silico", resulta ser de 115,6°, lo que es más acorde con una previsible hibridación sp<sup>2</sup> del nitrógeno que resultaría en una geometría regular con un electrón desapareado y cuyo ángulo teórico sería de 120°. La perturbación electrónica del electrón desapareado puede resultar en un menor ángulo de enlace, como es el caso (115,6°).

La molécula de NO<sub>2</sub>, tiene un potencial electrostático como el del NO, esencialmente negativo, pero con el vector del momento dipolar dirigido hacia los átomos de oxígeno (figura 2D), lo que es corroborado por el mapa de densidad electrónica del enlace (figura 2C), donde hay una diferenciación muy clara entre los electrones del enlace dirigidos a los átomos de oxígeno de la forma resonante y el electrón desapareado en el nitrógeno predominando, en este caso, el momento de enlace y el orbital de los oxígenos sobre el orbital del nitrógeno, al contrario de lo visto en el NO. Las diferencias son que en la molécula de NO<sub>2</sub>, el nitrógeno tiene un solo electrón sin compartir, mientras que en el NO tiene tres y que los dos átomos de oxígeno en el NO<sub>2</sub> ejercen una doble atracción de la nube electrónica de enlace, con respecto al NO. Debido a ello, el valor del momento orbital hacia el nitrógeno en el NO<sub>2</sub> será menor que en NO, mientras que será mayor el momento de enlace en el NO<sub>2</sub> con respecto al NO. Sin embargo, las diferencias encontradas "in silico" en los momentos dipolares de 0,24 D para el NO<sub>2</sub> y de 0,18 D para el NO, son poco significativas.

Finalmente, concluimos que el electrón desapareado se sitúa en el nitrógeno de la molécula de NO<sub>2</sub>, como ocurre en la de NO, según se puede apreciar en la figura 2B, donde la zona azul



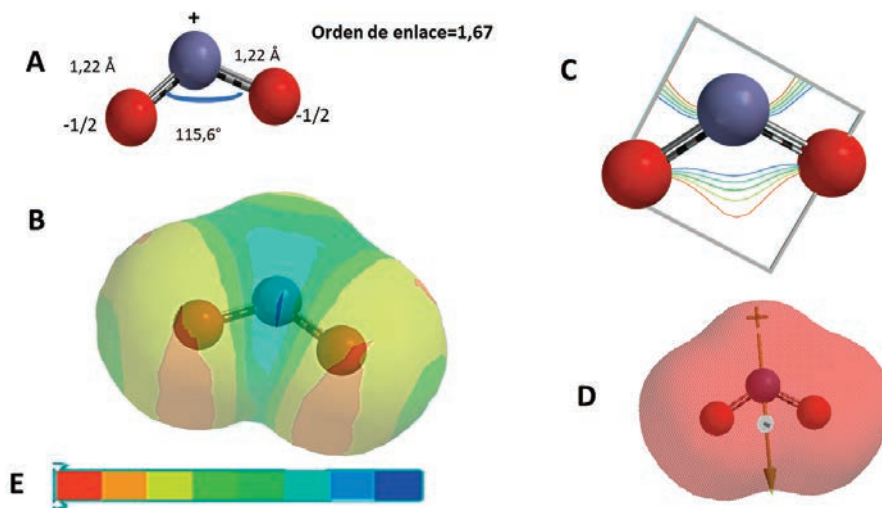


Figura 2. Modelo "in silico" del  $\text{NO}_2$  (Møller Plesset MP2/6-31G\*\*). A) Estructura molecular y cálculo de la longitud y orden de enlace: rojo oxígeno, azul nitrógeno. B) Mapa de densidad electrónica de espín. C) Mapa de densidad electrónica de enlace. D) Mapa de potencial electrostático. E) Leyenda de los mapas B y D: rojo carga electrostática negativa, azul positivo.

del electrón no enlazante se sitúa en el nitrógeno y las zonas rojas sobre los dos átomos de oxígeno, siendo estas últimas idénticas, lo que es indicativo de que el electrón de la forma resonante O-N-O se reparte por igual ( $\frac{1}{2}$  matemáticamente) entre los dos átomos. Este hecho, se refuerza con el modelo de densidad electrónica de enlace (figura 2C), antes comentado.

### 3. 2. Contribución a la contaminación atmosférica de los $\text{NO}_x$

Su contribución a la contaminación atmosférica se distingue a dos niveles cíclicos: troposférico y estratosférico.

A nivel de la troposfera, los  $\text{NO}_x$  pueden producir la formación y la destrucción del ozono troposférico mediante un ciclo de reacciones químicas. Este ciclo (figura 3), se inicia con el  $\text{NO}_2$  emitido a la atmósfera por sus fuentes de contaminación directas, el cual se descompone en óxido nítrico (NO) y oxígeno atómico (O)(1). El NO formado reacciona directamente con el ozono (2) para dar  $\text{NO}_2$  y  $\text{O}_2$ , por lo que se destruyen las moléculas de ozono, cerrándose el

ciclo con esa formación de  $\text{NO}_2$  a partir de la reacción (2). Sin embargo, también se puede crear ozono mediante la reacción (3), donde el oxígeno atómico de la reacción (1), reacciona con el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) para producir ozono. De esta manera, el  $\text{NO}_2$  resulta destructor y formador de moléculas de ozono, mientras que el NO, esencialmente, las destruye. Del equilibrio que se establezca en la atmósfera entre estos dos óxidos, dependerá el que se forme o se destruya el ozono troposférico, lo que es vital para la salud humana, ya que el ozono es un oxidante muy intenso de alta toxicidad, especialmente para los pulmones.

El ciclo descrito no requiere de catálisis alguna, pero también existe otro ciclo troposférico fotocatalítico, más complejo, donde intervienen los  $\text{NO}_x$  y que se describe en la figura 4.

El óxido nítrico emitido (1) esencialmente por los vehículos de motor (9), en unas 2 horas se transforma en  $\text{NO}_2$ , por reacción con el oxígeno atmosférico (2), al que se suma el emitido por sus propias fuentes de contaminación (3). El  $\text{NO}_2$ , por acción fotocatalítica de la luz UV (4), forma un radical  $\text{NO}^*$  muy reactivo y oxígeno

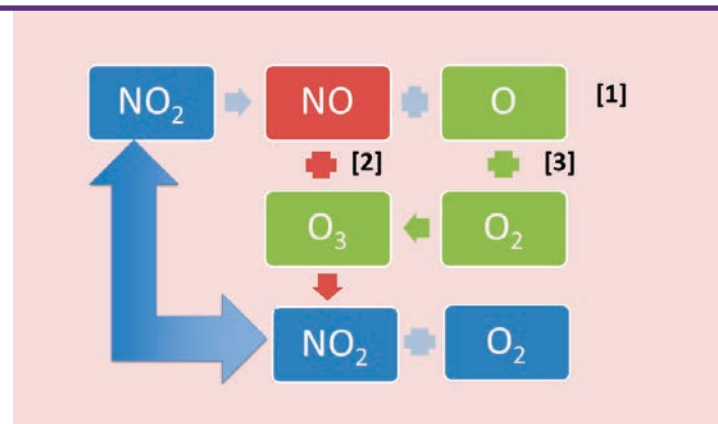


Figura 3. Ciclo de formación y descomposición de ozono troposférico por los  $\text{NO}_x$ .

atómico. Este último, reacciona con el oxígeno atómico atmosférico (5), resultando en la formación de ozono. Por su parte, el  $\text{NO}^*$  de la reacción (4) reacciona directamente con el ozono ( $\text{O}_3$ ) y lo descompone en oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y en un radical  $\text{NO}_2^*$  (6), también muy reactivo. Este radical, reacciona con el ozono (7), formando oxígeno molecular y un radical  $\text{NO}_3^*$ , por lo que se produce la destrucción de ozono como en la reacción (6). Finalmente, el  $\text{NO}_3^*$  reacciona con el agua de las nubes (8), cuya reacción conduce a la formación de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), uno de los constituyentes de la lluvia ácida, por lo que los  $\text{NO}_x$ , mediante estas reacciones fotocatalíticas también contribuyen a la formación de esa contaminación secundaria (9).

Los bioquímicos dicen que el óxido nítrico es un radical. Sin embargo, como hemos podido apreciar en la figura 4, hemos distinguido las dos moléculas,  $\text{NO}$  y el  $\text{NO}^*$  radical. La molécula de  $\text{NO}$  es paramagnética y muy reactiva, pero no es un radical. El  $\text{NO}^*$  se forma en reacción fotocatalíticas y es aún más reactivo.

Si comparamos las dos moléculas utilizando un modelo "in silico", nos da como resultado un valor diferencial de energía entre los orbitales LUMO y SOMO de 12,1 eV para el estado fundamental del  $\text{NO}$  y de 1,6 eV para su primer estado excitado  $\text{NO}^*$ , siendo ambos positivos y, por tanto, muy reactivos, pero con una diferencia mucho menor entre esos orbitales en el caso del  $\text{NO}^*$ , por lo que debe resultar más reactivo este último. Lo mismo sucede entre el  $\text{NO}_2$  (14,1 eV) y el  $\text{NO}_2^*$  (3,8 eV). La diferencia, consiste en que el electrón desapareado se sitúa en el nitrógeno de la molécula de  $\text{NO}$ , mientras que en el radical debe hacerlo sobre el oxígeno.

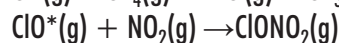
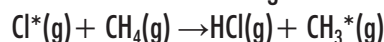
### 3. 3. Contribución al efecto invernadero y a la niebla fotoquímica

Los  $\text{NO}_x$  tienen una capacidad como gases de efecto invernadero que es unas 300 veces más potente que el  $\text{CO}_2$ . Los  $\text{NO}_x$  también contribuyen a las nieblas fotoquímicas. Por estos motivos y los mostrados anteriormente, es importante su control, por lo que se actualizan constantemente en los inventarios de emisiones y se controlan por los servicios de contaminación atmosférica urbanos con estaciones de medida de  $\text{NO}_x$  y otros contaminantes. Desde el espacio, se monitorizan las concentraciones de  $\text{NO}_2$  con satélites espaciales, como el proyecto Aura de la NASA, dentro de las medallas de calidad del aire contempladas en ese proyecto (10).

### 3. 4. Contribución a la destrucción de ozono estratosférico

Su contribución, en este caso, se puede considerar limitada al  $\text{NO}_2$ , que por reacción con  $\text{ClO}^*$  va a constituir un importante reservorio de cloro en forma de  $\text{ClONO}_2$ , ya que la destrucción del ozono estratosférico se produce en primavera por el cloro liberado desde esos depósitos (11-14).

En el invierno antártico, se producen en las nubes polares estratosféricas de la Antártida las siguientes reacciones:



El radical de cloro, proviene de los CFCs (fluorocarbonos). La segunda reacción elimina todo el  $\text{NO}_2$  de la atmósfera antártica. Se constituyen así, dos importantes depósitos que no reaccionan di-

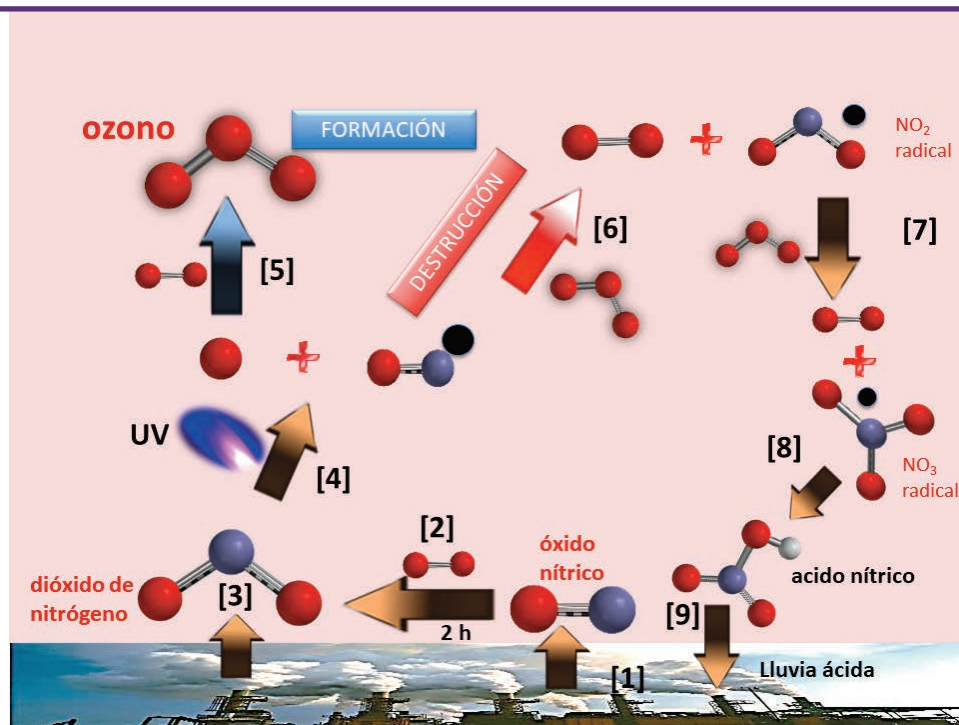
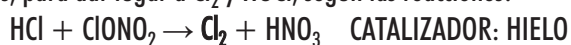


Figura 4. Ciclo fotocatalítico de formación y descomposición de ozono troposférico por los  $\text{NO}_x$ . Rojo oxígeno, azul nitrógeno, negro indica radical.



rectamente con ozono, a temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$  y menores. Durante el invierno, va reaccionando el  $\text{ClONO}_2$  con  $\text{HCl}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  a esas temperaturas, para dar lugar a  $\text{Cl}_2$  y  $\text{HOCl}$ , según las reacciones:



Cuando llega la primavera antártica y la luz hace su aparición, se liberan los depósitos de cloro mediante una reacción fotocatalítica en forma de  $\text{Cl}^*$ , el cual es capaz de descomponer directamente al ozono, produciendo  $\text{ClO}^*$  y  $\text{O}_2$ .

#### 4. CONCLUSIONES

El orden de enlace de la molécula de  $\text{NO}$  es de 2, no tiene formas resonantes y su potencial electrostático es negativo. El ángulo de enlace de la molécula de  $\text{NO}_2$  es de  $115,6^{\circ}$ , tiene una configuración resonante y es, esencialmente, de potencial electrostático negativo como el  $\text{NO}$ . El electrón desapareado se sitúa sobre el nitrógeno en ambas moléculas, mientras que las nubes electrónicas de enlace lo hacen, preferentemente, sobre los átomos de oxígeno. Resulta así diferencias, aunque poco significativas del momento dipolar (0,24 D para el  $\text{NO}_2$  y 0,18 D para el  $\text{NO}$ ). Los  $\text{NO}_x$  contribuyen a la formación y destrucción de ozono troposférico. La contribución de los  $\text{NO}_x$  a la formación y destrucción atmosférica de ozono es importante. Se puede considerar que, el  $\text{NO}_2$  es destructor y creador de ozono y el  $\text{NO}$  solo destructor de ozono.

#### 5. REFERENCIAS

1. Morrow, Paul E. Toxicological data on  $\text{NO}_x$ : an overview. 1984.
2. Pickrell, John A., et al. Respiratory Toxicology Following Inhalation of  $\text{NO}_x$ . 1982.
3. Shaw, Ian; Chadwick, John. Principles of environmental toxicology. CRC Press, 2018.
4. Shima, Masayuki. Health Effects of Air Pollution: A Historical Review and Present Status. Nihon eiseigaku zasshi. Japanese journal of hygiene, 2017, vol. 72, no 3, p. 159-165.
5. Shriver, Duward F.; Atkins, Peter William; LANGFORD, Cooper H. Química inorgánica. II. Reverté, 1998.
6. Sharpe, Alan G. Química inorgánica. Reverté, 1996.
7. Wells, Alexander Frank. Química inorgánica estructural. Reverte, 1978.
8. Haynes, William M.; Lide, David R.; Bruno, Thomas J. CRC handbook of chemistry and physics. CRC press, 2016.
9. Walsh, M. P. Mobile source related air pollution: effects on health and the environment. Encyclopedia of environmental health, 2011, vol. 3, p. 803-809.
10. Barnett, J. J., et al. Mapping the optical obscuration in the NASA

Aura HIRDLS instrument. En Infrared Spaceborne Remote Sensing 2005. SPIE, 2005. p. 103-112.

11. Stolarski, Richard S. The Antarctic ozone hole. Scientific American, 1988, vol. 258, no 1, p. 30-37.
12. Solomon, Susan. The mystery of the Antarctic ozone "hole". Reviews of Geophysics, 1988, vol. 26, no 1, p. 131-148.
13. Godin, Sophie. Ozone Hole. En Encyclopedia of Astronomy & Astrophysics. CRC Press, 2001. p. 1-4.
14. Turco, Richard P.; TOON, Owen B.; HAMILL, Patrick. Heterogeneous physicochemistry of the polar ozone hole. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 1989, vol. 94, no D14, p. 16493-16510.

Si desea citar nuestro artículo:

**Los óxidos de nitrógeno y su importancia en la contaminación atmosférica**

Antonio L. Doadrio Villarejo

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 345-350

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.01>

# REACTIVITY OF CURCUMIN AND CURCUMINOID $\beta$ -DIKETONES WITH *o*-AMINO-THIOPHENOL: SYNTHESIS OF 1,5-BENZOTHAZEPINES

## REACTIVIDAD DE LA CURCUMINA Y DE LAS $\beta$ -DICETONAS CURCUMINOIDES CON EL *o*-AMINOTIOFENOL: SÍNTESIS DE 1,5-BENZOTIAZEPINAS

Carlos A. Martínez<sup>2</sup>, Dionisia Sanz<sup>2\*</sup>, Rosa M. Claramunt<sup>2</sup>, José Elguero<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Académico de honor de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica y Bio-Organica, Facultad de Ciencias, UNED, Avenida Esparta s/n, E-28232 Las Rozas-Madrid, Spain

<sup>3</sup>Instituto de Química Médica, CSIC, Juan de la Cierva, 3. E-28006 Madrid, Spain

corresponding author: iqmb17@iqm.csic.es; dsanz@ccia.uned.es

### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

#### ABSTRACT

Four new 1,5-benzothiazepines were synthesized by reaction of *o*-aminothiophenol with curcumin and curcuminoid  $\beta$ -diketones, in methanol and in acetic acid. The mechanism involves a Michael addition on the CC double bond affording a benzothiazepine with two pendant groups, an aryl group adjacent to the sulfur atom and a 1-phenylethanone adjacent to the NH of the seven membered ring. 1D and 2D multinuclear NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F) in solution and <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR in solid state proved to be essential to elucidate the structures of these benzothiazepines, in particular their tautomerism. A secondary product has been identified that has the structure of a benzothiazole.

#### RESUMEN

Se han sintetizado cuatro nuevas 1,5-benzotiazepinas por reacción del *o*-aminotiofenol con curcumina y  $\beta$ -dicetonas curcuminoides, en metanol y en ácido acético. El mecanismo implica una adición de Michael sobre el doble enlace CC que conduce a una benzotiazepina con dos sustituyentes, un grupo arilo adyacente al átomo de azufre y una 1-feniletanona adyacente al NH del anillo de siete miembros. RMN multinuclear 1D y 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F) en disolución y RMN <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en estado sólido han demostrado ser esenciales para dilucidar las estructuras de estas benzotiazepinas, en particular su tautomería. Se ha identificado un producto secundario que tiene la estructura de un benzotiazol.

#### Keywords:

Curcumin  
 $\beta$ -Diketones  
Aminothiophenol  
1,5-Benzothiazepines

#### Palabras Clave:

curcumina  
 $\beta$ -Dicetonas  
aminotiofenol  
1,5-Benzotiazepinas



## 1. INTRODUCCIÓN

Benzothiazepines are structures that present a large projection at the pharmacological level. Although there is currently only one benzothiazepine structure marketed as a medicine, there are numerous scientific studies proposing new possible applications of very different benzothiazepine derivatives (1). Recently, five papers reporting the synthesis of 2,4-diaryl-1,5-benzothiazepines have been published (2,3,4,5,6) as well as a review (7). In these papers are reported some structures of representative drugs, in clinical use or undergoing clinical trials (Figure 1). Therefore, it seems appropriate to search for simple, efficient and reproducible synthesis of benzothiazepines.

On the other hand, curcumin is a widely studied compound, and its accessibility and chemical properties make it an easily manipulated structure, with no health risks and little environmental contamination. Likewise, it has defined and studied pharmacological properties, and obtaining new curcumin derivatives could lead to new structures with the same or other pharmacological properties (8).

The reactivity of curcumin and curcuminoid derivatives with *o*-aminothiophenol analyzed in this work generates benzothiazepines as final structures. Although reaction of *o*-aminothio-

phenol with  $\alpha,\beta$ -ethylenic ketones, in particular chalcones, is much more common than with  $\beta$ -diketones, these last compounds have also been studied (9,10,11,12). The compounds that we are going to study in the present work have both functionalities making them interesting. In addition, the use of different reaction conditions is important when determining which route is best suited for future applications.

The objectives of the present work can be summarized in the following three points:

1. Preparation of the starting curcuminoid derivatives,  $\beta$ -diketones, represented in Figure 2 as the major existing keto-enol tautomer (13).
2. Synthesis of benzothiazepine derivatives by reaction of the  $\beta$ -diketones with *o*-aminothiophenol. If curcuminoid diketones react as  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones (chalcones) isomers A and B will be formed, but if they do so as 1,3-dicarbonyl compounds pair of isomers C and D could result (Figure 3).
3. Establish the structure of all compounds obtained by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR in solution, as well as in solid state by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  CPMAS.

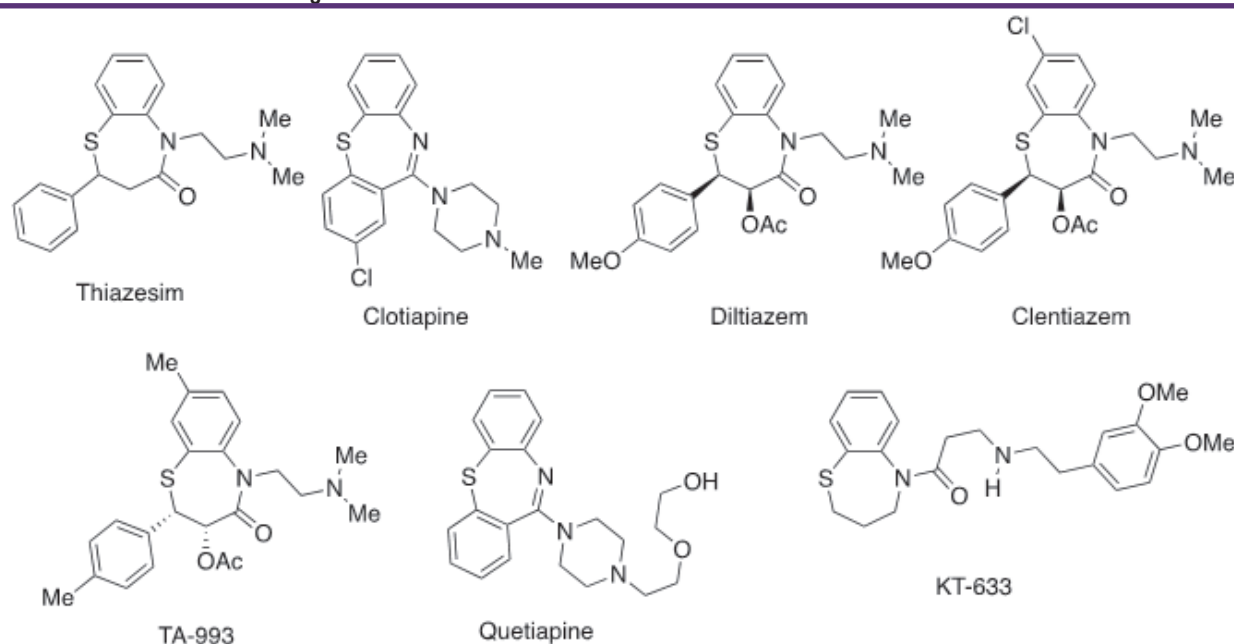


Figure 1. Some structures of representative drugs with a 1,5-benzothiazepine skeleton

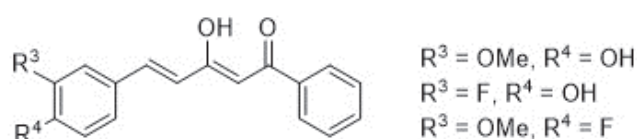


Figure 2. Curcuminoid diketones for use as starting compounds

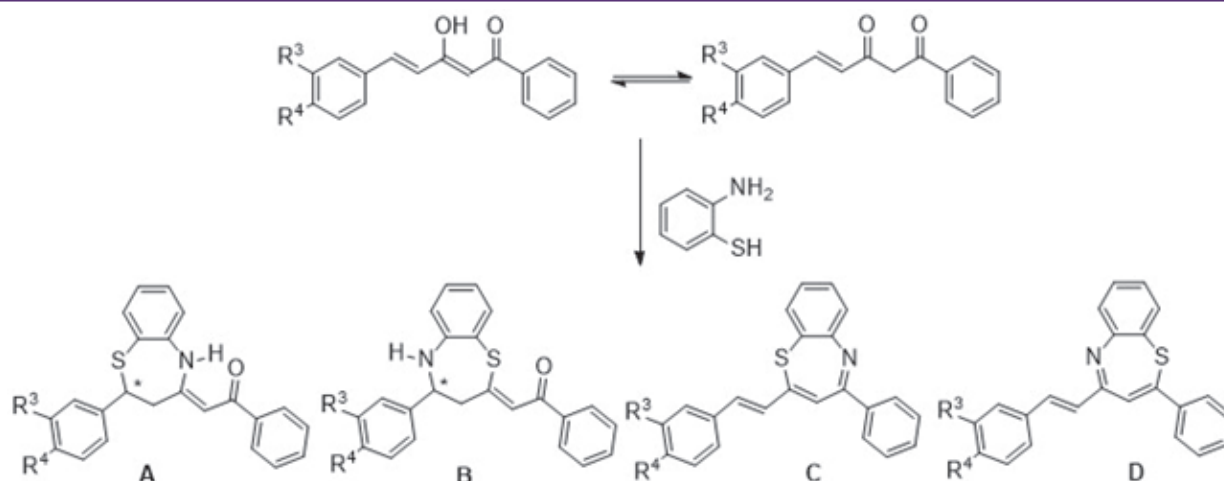


Figure 3. Possible benzothiazepines that can be obtained in the proposed reactions

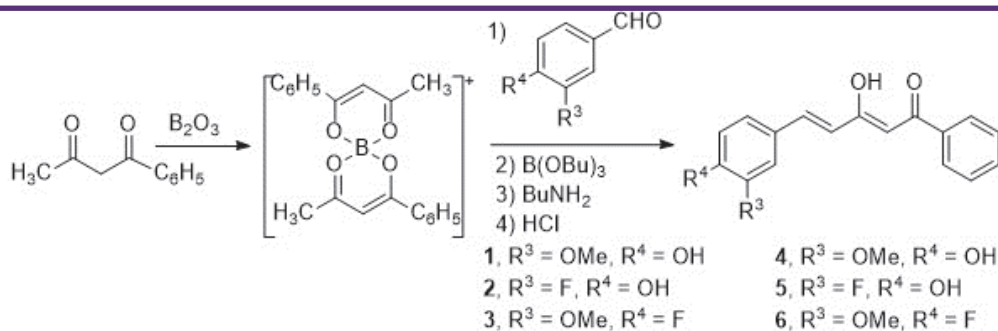
## 2. RESULTS AND DISCUSSION

### 2.1. Synthesis of $\beta$ -diketones

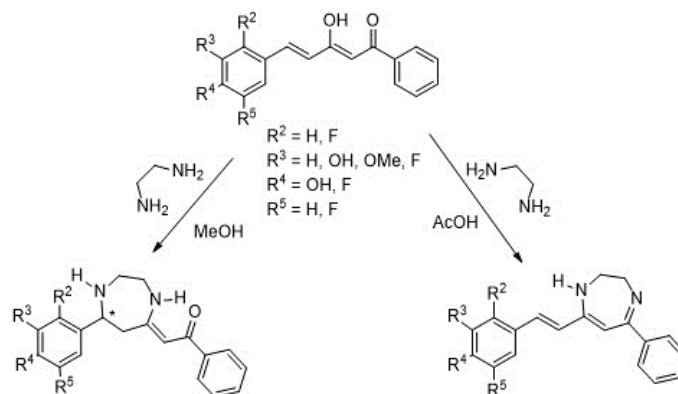
The synthesis of the starting diketones has been carried out following the Pabon method (14) and the procedure previously used in our research group (13,15,16,17). First, a dicarbonyl compound, in our case 1-phenyl-1,3-butanedione, is complexed with boron oxide. Next, a disubstituted benzaldehyde is added, which reacts with the terminal methyl group of the diketone, and *n*-butylamine is added dropwise. As a result of the

condensation of benzaldehyde and boron complex, water is formed, so *n*-tributyl borate is used to remove it. Finally, hydrochloric acid is added, thus creating an acid medium in which the boron complex dissociates from the curcuminoid derivatives.

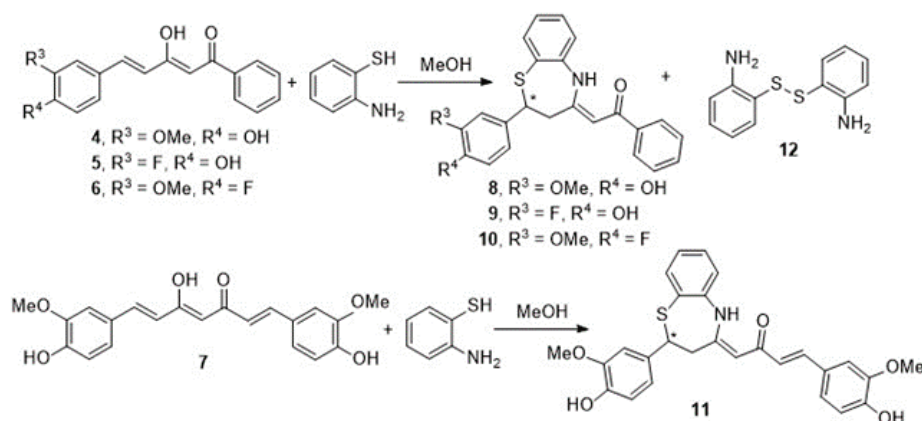
Using 1-phenyl-1,3-butanedione as initial compound and the benzaldehydes selected for this work: 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) (1), 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde (2) and 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (3), curcuminoid diketones (4-6) are obtained with acceptable yields, 50-60% (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of the starting diketones



Scheme 2. Reactivity of styrenic diketones with ethylenediamine



Scheme 3. Benzothiazepines obtained by reaction of curcumin and curcuminoid diketones with *o*-aminothiophenol in methanol

## 2.2. Study of the reactivity of $\beta$ -diketones with *o*-aminothiophenol

In previous works carried out in our laboratory (18,19), the reaction of curcuminoid diketones with ethylenediamine has shown a double reactivity depending on the reaction medium (Scheme 2), giving rise to different diazepine structures (Scheme 2). In methanol, ethylenediamine attacked the chalcone via a Michael addition forming a diazepine analogue to A (Figure 3) with a C=O group hydrogen bonded to the enamine NH stabilizing the structure. However, when the reaction medium was acetic acid, ethylenediamine attacked both keto carbons, generating another diazepine, related to C (Figure 3) without altering the double bond of the initial diketone.

Therefore, we have analyzed the reactivity of curcumin and curcuminoid diketones with *o*-aminothiophenol, both in methanol and in acetic acid, to see if similar results will be obtained.

### 2.2.1. Reactivity in methanol

The reaction of diketones 4-6 and curcumin 7 with *o*-aminothiophenol, in methanol, leads only to benzothiazepines 8-11 by a Michael-type reaction, in which the SH group attacks to the double bond, accompanied in all cases by the disulfide 12 formed by oxidation of *o*-aminothiophenol (Scheme 3). Structures 8-10 correspond to type A of Figure 3.

The evolution of the reactions has been followed by <sup>1</sup>H NMR, since in our hands thin layer chromatography has not allowed to discriminate between the diketone and the benzothiazepine, clearly observing the formation of the ABX system of the benzothiazepine ring (−2.70, −2.95 and −4.85 ppm), and the presence of a new double bond. As shown in the case of diketone 4 (Figure 4) the enamine double bond appears as a singlet at 5.9-6 ppm, more shielded than that belonging to the enol form of the diketone; at the end of the reaction (six h) the diketone/benzothiazepine ratio is

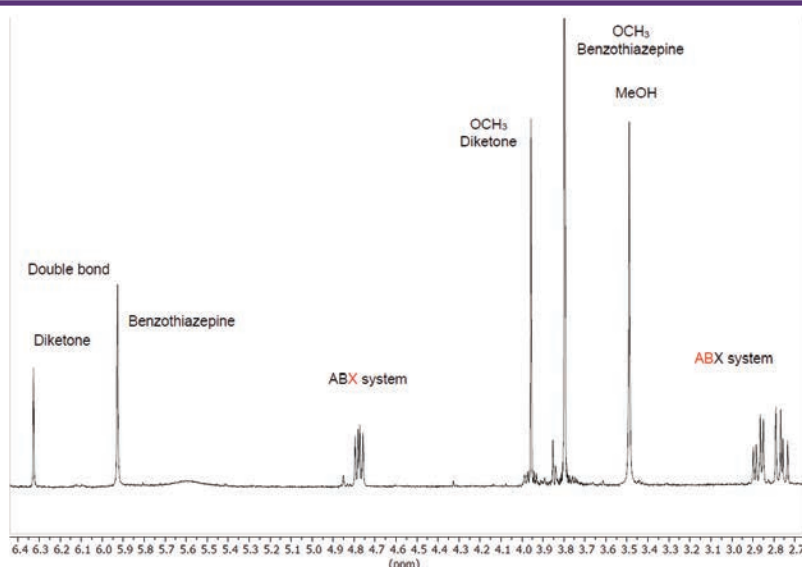
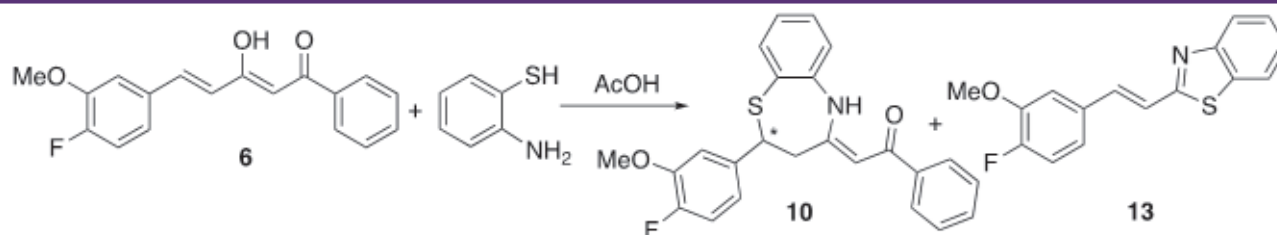


Figure 4. Enlargement of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum in CDCl<sub>3</sub> of the reaction crude of diketone 4 with *o*-aminothiophenol



Scheme 4. Reactivity of curcuminoid diketone 6 with *o*-aminothiophenol in acetic acid

1/2.5-4.1, which means a yield of 71-80%. This proportion is not modified by leaving the reaction longer or adding more quantity of *o*-aminothiophenol.

The isolation of the products is very difficult because benzothiazepine and diketone have the same *R<sub>f</sub>* in the solvents used: mixtures in different proportions of  $\text{Cl}_2\text{CH}_2/\text{EtOH}$  and hexane/ $\text{AcOEt}$ . For this reason, it has been necessary to carry out several chromatographies, in order to isolate the final product pure, with fair yields. The *o*-aminothiophenol dimer 12 has also been isolated, and its structure confirmed by NMR (see Supporting Information figures S-36-S39).

### 2.2.2. Reactivity in acetic acid

Curcumin and the aforementioned curcuminoid derivatives were also reacted in glacial acetic acid with *o*-aminothiophenol. Although the same benzothiazepines 8-11 are formed as those generated in methanol (Scheme 3), dimer 12 is not obtained, and on the other hand the reaction is quantitatively complete in 2 h. In this case, the problem was that when removing the acetic acid in the rotary evaporator, the benzothiazepine decomposes due to the temperature effect forming benzothiazoles (Figure 5). In this way, it has been possible to isolate and characterize a new structure, the 2-(4-fluoro-3-methoxystyryl)benzo[d]thiazole 13, a solid with *mp* = 127°C. (Scheme 4).

Since the formation of benzothiazole 13 was unexpected, we will discuss in detail the characterization of its structure, clearly different from that of the rest of the isolated compounds, which are described in section 2.3. To number the compound, the benzothiazole ring has been prioritized, then the double bond, and finally the substituted phenyl (Figure 6).

The  $^1\text{H}$ -NMR (Figure 5) and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of this derivative are simpler than those of benzothiazepines, taking into account that this derivative lacks the signals corresponding to the ABX system. From the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum (Figure 7) we observe that the sequence of the H of the benzo part is: 8.00 (ddd,  $^3J_{\text{H}_5} = 8.2$ ,  $^4J_{\text{H}_6} = 1.2$ ,  $^5J_{\text{H}_7} = 0.7$ , H4), 7.48 (ddd,  $^3J_{\text{H}_4} = 8.5$ ,  $^3J_{\text{H}_6} = 7.2$ ,  $^4J_{\text{H}_7} = 1.3$ , H5). 7.38 (ddd,  $^3J_{\text{H}_7} = 8.0$ ,  $^3J_{\text{H}_5} = 7.2$ ,  $^4J_{\text{H}_4} = 1.2$ , H6), 7.86 (ddd,  $^3J_{\text{H}_6} = 8.0$ ,  $^4J_{\text{H}_5} = 1.3$ ,  $^4J_{\text{H}_4} = 0.6$ , H7); the double bond signals, 7.46 (d,  $^3J_{\text{H}_1'} = 16.3$ , H2'), 7.32 (d,  $^3J_{\text{H}_2'} = 16.3$ , H1') and those belonging to the fluorinated ring 7.19 (d,  $^4J_{\text{F}} \approx 9$ , H2''), 7.11 (m, H5'', H6''), 3.95 (s, OMe).

To assign the quaternary carbons we have used the correlations observed in the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC correlation spectrum (Table 1). The rest of the carbons can be assigned using the correlations in the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC spectrum, as well as the C-F couplings in the 4-fluoro-3-methoxyphenyl ring, of carbons C4'' ( $^1J_{\text{F}} = 250.5$ ), C5'' ( $^2J_{\text{F}} = 18.8$ ), C3'' ( $^2J_{\text{F}} = 11.3$ ), C6'' ( $^3J_{\text{F}} = 7.5$ ), C2'' ( $^3J_{\text{F}} = 2.5$ ), C1'' ( $^4J_{\text{F}}$

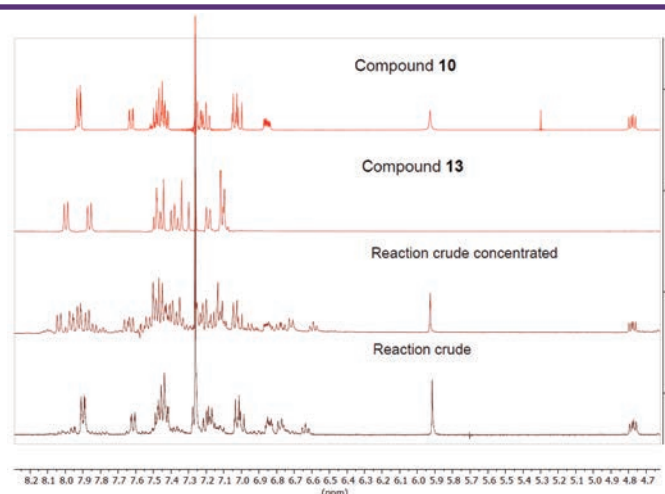


Figure 5.  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$  of the reaction crude together with the isolated products



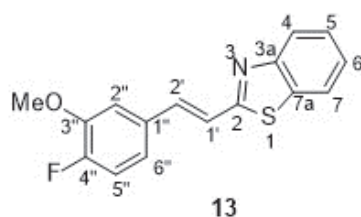


Figure 6. Compound 13 [(E)-2-fluoro-3-methoxystyryl]benzo[d]thiazole

= 3.8), C2' ( $^5J_F = 1.9$ ) and C1' ( $^6J_F = 3.1$ ), with coupling constants from one to six bonds away. The values of the chemical shifts and coupling constants C-F are similar to those described for the aldehyde 3 and the starting diketone 6 (16,20).

Regarding  $^{15}\text{N}$ , the chemical shift is  $-75.7$  ppm, a typical value of a nitrogen atom with  $sp^2$  hybridization (19), as it corresponds to the one (N3) present in the benzothiazole structure. In addition, it is coupled to H1' (7.32) as observed in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$ .

On the other hand, there is in the  $^{19}\text{F}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$  (Figure 8), where we observe that the signal obtained, at  $-132.9$ , is a ddd, with two coupling constants  $^4J$  with  $\text{H}_2'$  and  $\text{H}_6'$ ,  $^4J_{\text{H}_2'} = 8.3$  and  $^4J_{\text{H}_6'} = 6.4$ , and a  $^3J$  with  $\text{H}_5'$   $^3J_{\text{H}_5'} = 8.4$ .

### 2.3. NMR structural characterization

In this section, we will show that the benzothiazepine structure formed in the reaction corresponds to type A (Figure 3). The isomeric type B, which also presents an ABX system, has been ruled out on the basis of the  $^{15}\text{N}$  chemical shift value, as discussed later in section 2.3.3.

The four benzothiazepines obtained 8-11 have been analyzed by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopies and the values of the chemical shifts are gathered in Tables 2 and 3. The assignments

are based on the multiplicity of the signals and the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations encountered in the HMQC and HMBC correlation spectra.  $\text{DMSO}-d_6$  has been used as solvent for the NMR analysis in all cases, and also  $\text{CDCl}_3$  in compounds 8 and 10. For the sake of clarity, when numbering the compounds rather than following IUPAC nomenclature, priority has been given to the benzothiazepine nucleus, then to the chalcone, and finally to the pendant aryl groups (Figure 9).

#### 2.3.1. $^1\text{H}$ NMR

Regarding the  $^1\text{H}$  NMR data (Table 2), note the presence of the ABX system (Figure 10), in the four benzothiazepine isomers 8-11. The protons at position 3 are anisochronous (diastereotopic) because C2 is chiral; note that all our compounds are racemic.

In Figure 10, corresponding to the ABX system of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 8, we observe a dd at 4.86 ppm, which corresponds to nucleus X, which is coupled to two neighboring hydrogens (A and B), with different coupling constants  $^3J = 10.6$  and  $^3J = 5.5$  Hz. On the other hand, the protons of position 3 that form the AB part, resonate at 2.71 and 2.94 ppm coupled with HX, and a geminal constant  $J_{\text{AB}} = 13.1$  Hz.

The analysis of the spectrum of compound 9 (Figure 11) shows the following features: the ABX system between 2.6 and 4.9 ppm; a singlet at 6.27 ppm, which corresponds to the proton in position 1'; H6 and H9 appear as doublets with a  $^3J \approx 7$  Hz, and in all cases  $\delta\text{H}_9 (\sim 7.6) > \delta\text{H}_6 (\sim 7.3)$ . The signals of H7 and H8 are triplets, H8 being more shielded than H7, and H7 coming out together with  $\text{H}_m$  and  $\text{H}_o$ .

Concerning the aryl group that comes from the aldehyde, in the fluorinated compounds 9 and 10 it has been possible

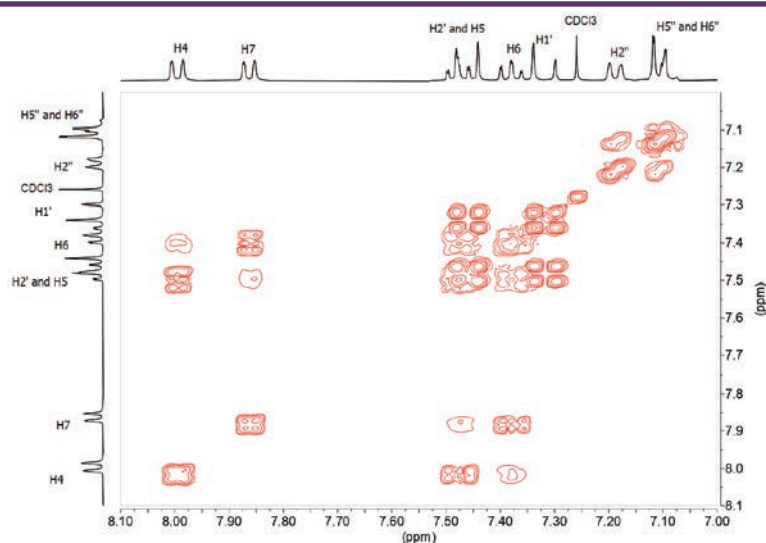


Figure 7.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$  of compound 13

**Table 1.**  $^{13}\text{C}$  chemical shifts and correlations observed in the HMQC and HMBC spectra of compound 13 in DMSO- $d_6$  as well as  $^{15}\text{N}$  and  $^{19}\text{F}$  data

$\delta$	HMQC	HMBC	SSCC	assignment
166.7	---	7.46 (H2'), 7.32 (H1')		C2
153.7	---	7.86 (H7), 7.48 (H5)		C3a
153.2	---	7.19 (H2'')	$^1J_F = 250.5$	C4''
148.1	---	7.19 (H2''), 3.95 (OMe)	$^2J_F = 11.3$	C3''
136.7	7.46 (H2')	7.32 (H1'), 7.19 (H2'')	$^3J_F = 1.9$	C2'
			$^1J = 156.2$	
134.3	---	8.00 (H4), 7.38 (H6)		C7a
132.1	---	7.32 (H1'), 7.11 (H5'')	$^4J_F = 3.8$	C1''
126.4	7.48 (H5)	7.86 (H7)	$^1J = 161.1$	C5
			$^3J = 7.9$	
125.5	7.38 (H6)	8.00 (H4)	$^1J = 161.7$	C6
			$^3J = 8.0$	
123.0	8.00 (H4)	7.38 (H6)	$^1J = 162.8$	C4
			$^3J = 8.0$	
121.9	7.32 (H1')	7.46 (H2')	$^6J_F = 3.1$	C1'
			$^1J = 161.6$	
121.6	7.86 (H7)	7.48 (H5)	$^1J = 164.2$	C7
			$^3J = 8.5$	
120.8	7.11 (H6'')	7.46 (H2'), 7.19 (H2'')	$^3J = 7.5$	C6''
			$^1J = 162.6$	
116.5	7.11 (H5'')	----	$^2J = 18.8$	C5''
			$^1J = 163.3$	
111.6	7.19 (H2'')	7.46 (H2'), 7.11 (H6'')	$^3J = 2.5$	C2''
			$^1J = 157.8$	
56.2	3.95 (OMe)	----	$^1J = 144.8$	OMe
	----	----	----	
-75.7	---	7.32 (H1')	----	N3
	----	----	----	
-132.9	----	----	$^3J = 8.4$	F4
			$^4J = 8.3$	
			$^4J = 6.4$	

to measure all the H-F couplings (Table 2). The signal of the NH proton appears at 12.57 ppm, due to the fact that it forms a hydrogen bond with CO. Finally, the signals of the protons of the lateral phenyl group are:  $H_o \sim 7.9$  ppm and  $H_m$  and  $H_p \sim 7.5$ -7.4 ppm. It should be noted that the OH signal in the 4' position has only been observed in DMSO- $d_6$  at around 9 ppm.

### 2.3.2. $^{13}\text{C}$ NMR

In the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Table 3), the chemical shifts of the carbons have similar values in the four benzothiazepines 8-11, facilitating their assignment once the pattern of the different signals has been established by 1D and 2D experiments.

For the side chain we have the signal corresponding to C1'' (it can be seen attached to H1'' in HMQC) at  $\sim 94$  ppm, very different from C2'', which bonded to an oxygen nucleus, gives a sig-

nal at 188 ppm. For the phenyl group,  $\text{C}_6\text{H}_5$ , in diazepines 8, 9, and 10 the signals of  $\text{C}_o \sim 127$ ,  $\text{C}_m \sim 128$  and  $\text{C}_p \sim 131$  ppm are observed, with coupling constants  $^3J = ^3J = 7$  Hz in  $\text{C}_o$  and  $\text{C}_p$  and  $^3J = 7.5$  Hz in  $\text{C}_m$ .  $\text{C}_i$  appears at  $\sim 139$  ppm. In all three benzothiazepines,  $\delta\text{C}_i > \delta\text{C}_p > \delta\text{C}_m > \delta\text{C}_o$ .

At  $\sim 54$  ppm we find a signal corresponding to C2, and at  $\sim 40$  ppm there is the signal of C3, both carbons belonging to the nuclei of seven membered ring. The C4 signal appears at  $\sim 161$  ppm as it is  $\text{sp}^2$  hybridized and bound to a nitrogen. The rest of the carbons of the benzothiazepine show shifts  $\delta\text{C5a} (\sim 142) > \delta\text{C9} (\sim 135) > \delta\text{C7} (\sim 130) > \delta\text{C8} (\sim 126) > \delta\text{C9a} (\sim 126) > \delta\text{C6} (\sim 123)$ , as occurs in related benzothiazepines (21), the assignment of the carbons that appear at  $\sim 126$  ppm does not present problems since they are a CH and a quaternary carbon.



**Table 2.**  $^1\text{H}$  NMR parameters ( $\delta$  in ppm and  $J$  in Hz) of benzothiazepines 8-11

Atom	8		9	10		11
	$\text{CDCl}_3$	$\text{DMSO}-d_6$	$\text{DMSO}-d_6$	$\text{CDCl}_3$	$\text{DMSO}-d_6$	$\text{DMSO}-d_6$
H2	4.78 (dd) $^3J=9.1, ^3J=5.7$ 2.76 (dd) $^2J=13.3, ^3J=9.1$	4.86 (dd) $^3J=10.6, ^3J=5.5$ 2.71 (dd) $^2J=13.1, ^3J=10.7$	4.89 (dd) $^3J=11.0, ^3J=5.4$ 2.69 (dd) $^2J=13.1, ^3J=11.1$	4.78 (dd) $^3J=9.4, ^3J=5.7$ 2.76 (dd) $^2J=13.4, ^3J=9.3$	4.96 (dd) $^3J=11.0, ^3J=5.5$ 2.74 (dd) $^2J=13.2, ^3J=11.0$	4.81 (dd) $^3J=10.1, ^3J=5.6$ 2.65 (dd) $^2J=13.3, ^3J=10.1$
H3 (2)	2.88 (dd) $^2J=13.3, ^3J=5.8$ 7.24 (dd) $^3J=8.0, ^4J=1.4$	2.94 (dd) $^2J=13.1, ^3J=5.6$ 7.38 (dd) $^3J=8.0, ^4J=1.4$	2.93 (dd) $^2J=13.1, ^3J=5.4$ 7.38 (dd) $^3J=8.0, ^4J=1.4$	2.88 (dd) $^2J=13.4, ^3J=5.8$ 7.24 (dd) $^3J=7.9, ^4J=1.4$	2.97 (dd) $^2J=13.2, ^3J=5.5$ 7.39 (dd) $^3J=8.0, ^4J=1.4$	2.81 (dd) $^2J=13.3, ^3J=5.6$ 7.08 (dd) $^3J=8.2, ^4J=1.9$
H6	7.51–7.40 (m) 7.19 (td) $^3J=7.5, ^4J=1.4$	7.57–7.47 (m) 7.25 (td) $^3J=7.5, ^4J=1.5$	7.55–7.47 (m) 7.25 (td) $^3J=7.5, ^4J=1.5$	7.52–7.41 (m) 7.20 (td) $^3J=7.5, ^4J=1.4$	7.57–7.47 (m) 7.26 (td) $^3J=7.5, ^4J=1.5$	7.47 (m) 7.22 (td) $^3J=7.5, ^4J=1.4$
H7	7.63 (dd) $^3J=7.7, ^4J=1.5$	7.61 (dd) $^3J=7.7, ^4J=1.5$	7.57 (dd) $^3J=7.6, ^4J=1.5$	7.63 (dd) $^3J=7.7, ^4J=1.6$	7.62 (dd) $^3J=7.7, ^4J=1.6$	7.59 (dd) $^3J=7.7, ^4J=1.5$
H8	6.95 (d) $^4J=2.0$ 6.86 (d) $^3J=8.1$	6.92 (d) $^4J=2.0$ 6.70 (d) $^3J=8.1$	7.11 (d) $^3J_F=12.4, ^4J=2.2$ 6.89 (d) $^4J_F=9.2, ^3J=8.3$	7.04 (d) $^4J_F=8.2, ^4J=2.5$ 7.02 (d) $^3J_F=11.2, ^3J=8.3$	7.15 (d) $^4J_F=8.4, ^4J=2.2$ 7.15 (d) $^3J_F=11.5, ^3J=8.3$	6.92 (d) $^4J=2.0$ 6.69 (d) $^3J=8.1$
H5'	6.82 (dd) $^3J=8.2, ^4J=2.0$	6.76 (dd) $^3J=8.2, ^4J=2.1$	6.99 (dd) $^3J=8.4, ^5J_F=2.2$	6.85 (ddd) $^3J=8.3, ^4J_F=4.2, ^4J=2.2$	6.9 (ddd) $^3J=8.4, ^4J_F=4.3, ^4J=2.2$	6.74 (dd) $^3J=8.1, ^4J=2.0$
H6'	5.91 (br)	6.26 (s)	6.27 (s)	5.93 (s)	6.29 (s)	5.64 (s)
H1''	-----	-----	-----	-----	-----	6.78 (d) $^3J=15.9$
H3''	-----	-----	-----	-----	-----	7.41 (d) $^3J=15.9$
H4''	-----	-----	-----	-----	-----	-----
H <sub>o</sub>	7.92 (m)	7.96 (m)	7.96 (m)	7.92 (m)	7.96 (m)	-----
H <sub>m</sub>	7.51–7.40 (m)	7.57–7.47 (m)	7.55–7.47 (m)	7.52–7.41 (m)	7.57–7.47 (m)	-----
H <sub>p</sub>	7.51–7.40 (m)	7.57–7.47 (m)	7.55–7.47 (m)	7.52–7.41 (m)	7.57–7.47 (m)	-----
H2'''	-----	-----	-----	-----	-----	7.27 (d) $^4J=2.0$
H5'''	-----	-----	-----	-----	-----	6.79 (d) $^3J=8.2$
H6'''	-----	-----	-----	-----	-----	7.08 (dd) $^3J=8.2, ^4J=1.9$
NH	12.79 (br)	12.61 (s)	12.57 (s)	12.78 (s)	12.58 (s)	12.60 (s)
OMe 3'	3.80 (s)	3.68 (s)	-----	3.81 (s)	3.77 (s)	3.70 (s)
OH 4'	n. o.	8.97 (s)	9.87 (s)	-----	-----	8.97 (s)
OMe 3'''	-----	-----	-----	-----	-----	3.82 (s)
OH 4'''	-----	-----	-----	-----	-----	9.46 (s)

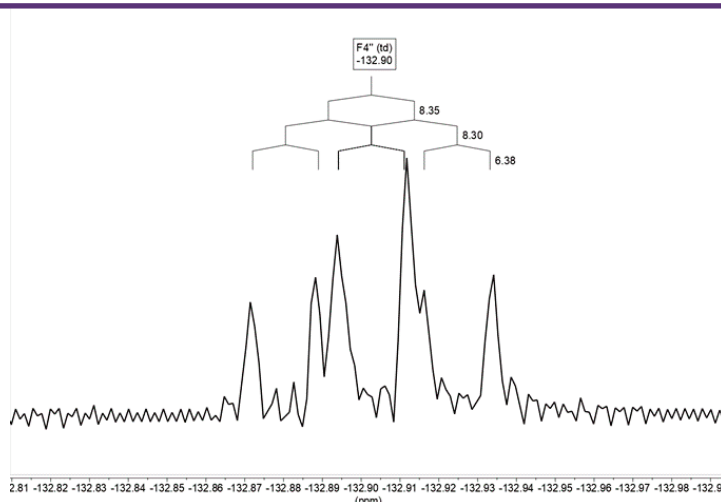


Figure 8.  $^{19}\text{F}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$  of compound 13

Next, we find the signals of the  $^{13}\text{C}$  spectrum of the substituted phenyl: all of them show the same pattern as the precursor diketones and aldehydes (16,20) both in chemical shifts and in C-F coupling constants. Finally, the 3' OMe carbon signal for 8, 10 and 11 appears around 56 ppm.

We will discuss in more detail the assignments in [4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene)but-3-en-2-one] 11, which presents different  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  signals for the two 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups.

The following connections arise from the correlations observed in the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum (Figure 12).

- 6.69 ( $\text{H}5'$ )  $\Leftrightarrow$  6.74 ( $\text{H}6'$ )  $\Leftrightarrow$  6.92 ( $\text{H}2'$ ) 4-hydroxy-3-methoxyphenyl, thiazepine side
- 7.41 ( $\text{H}4''$ ) 6.78 ( $\text{H}3''$ ) double bond
- 6.79 ( $\text{H}5''$ )  $\Leftrightarrow$  7.08 ( $\text{H}6''$ )  $\Leftrightarrow$  7.27 ( $\text{H}2''$ ) 4-hydroxy-3-methoxyphenyl, styrene side
- 7.59 ( $\text{H}9$ )  $\Leftrightarrow$  7.22 ( $\text{H}8$ )  $\Leftrightarrow$  7.47 ( $\text{H}7$ )  $\Leftrightarrow$  7.31 ( $\text{H}6$ ) benzo moiety.

From the connections observed in the HMQC spectrum all pairs of CH signals are found (see Supplementary material). On

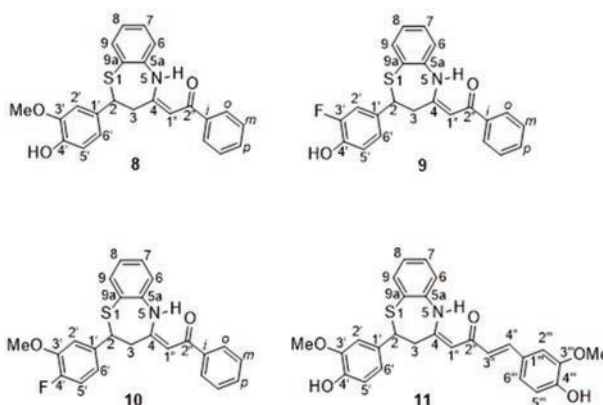


Figure 9. Atom numbering of compounds 8-11

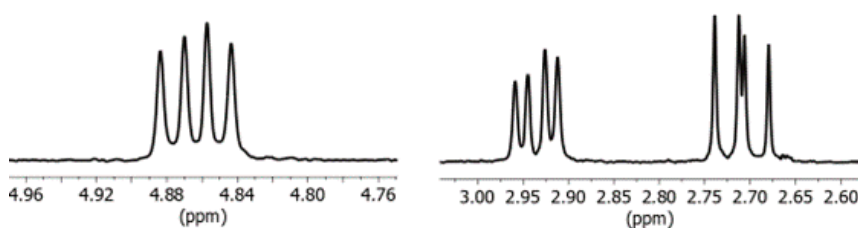


Figure 10.  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$ , the ABX system of benzothiazepine 8



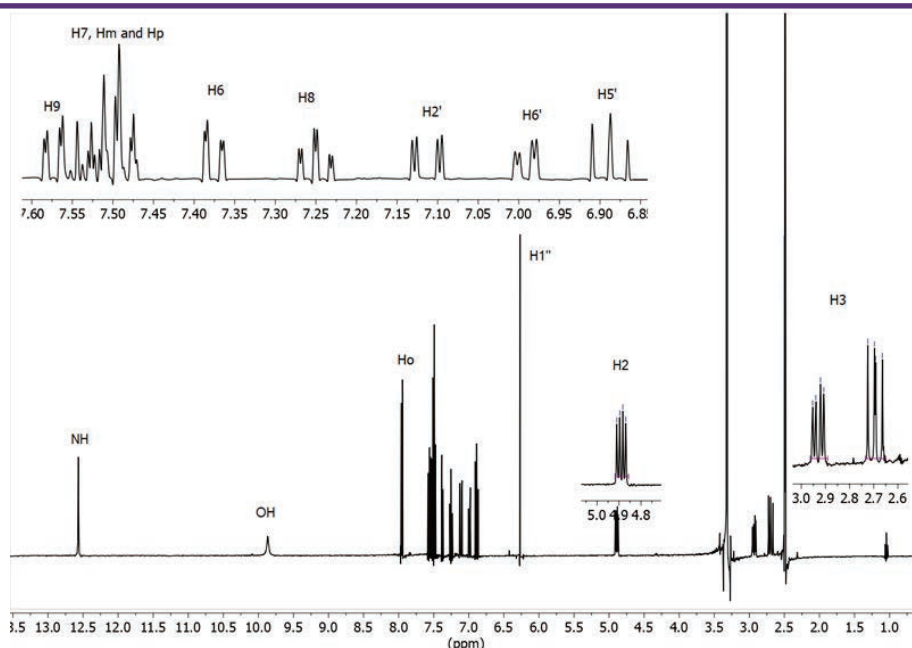


Figure 11.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of benzothiazepine 9

the other hand, the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC correlation spectrum also provides useful information, especially about the quaternary carbons, we observe that the OH signal that appears at 8.97 ppm is correlated with the carbons at 147.3 ( $\text{C3}'$ ), 146.0 ( $\text{C4}'$ ) and 115.2 ( $\text{C5}'$ ) (Figure 13). The 146.0 signal shows long distance correlation ( $^3J$ ) with 6.92 ( $\text{H2}'$ ) and 6.74 ( $\text{H6}'$ ) and the 147.3 signal ( $\text{C3}'$ ) shows crossing peaks with 3.70 ( $\text{OMe}'$ ) and 6.69 ( $\text{H5}'$ ), so we know the signals that belong to each 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ring (Figure 13); to know which side they are on we rely on the correlation that the signal of 139.0 ( $\text{C4}''$ ) presents with 7.08 ( $\text{H6}'''$ ) and 7.27 ppm ( $\text{H2}'''$ ) (see Supplementary material).

Finally, the  $^{13}\text{C}$  solid-state NMR spectra of the four benzothiazepines were also recorded and the assignment of the signals

achieved by analogy with the data obtained in solution.

### 2.3.3. $^{15}\text{N}$ and $^{19}\text{F}$ NMR

The benzothiazepines studied in this work can exist as two tautomers: the keto-enamine and the imino-enol forms (Figure 14).

From the  $^{15}\text{N}$  chemical shift value, observed at  $-255.0$  in solution and  $-251.2$  ppm in solid state for 8;  $-255.1$  in solution and  $-246.2$  in solid state for 9 (Figure 15);  $-255.2$  in solution and  $-253.3$  in solid state for 10, and  $-257.6$  in solution and  $-245.7$  in solid state for 11, it can be deduced that the tautomer that predominates is the keto-enamine, since in the imino-enol form the chemical shift should be in the order of  $-70$  to  $-100$  ppm (22).

The spectra of  $^{19}\text{F}$  NMR have also been recorded for benzothiazepines 9 and 10 in  $\text{DMSO}-d_6$ , determining both the chemical shifts

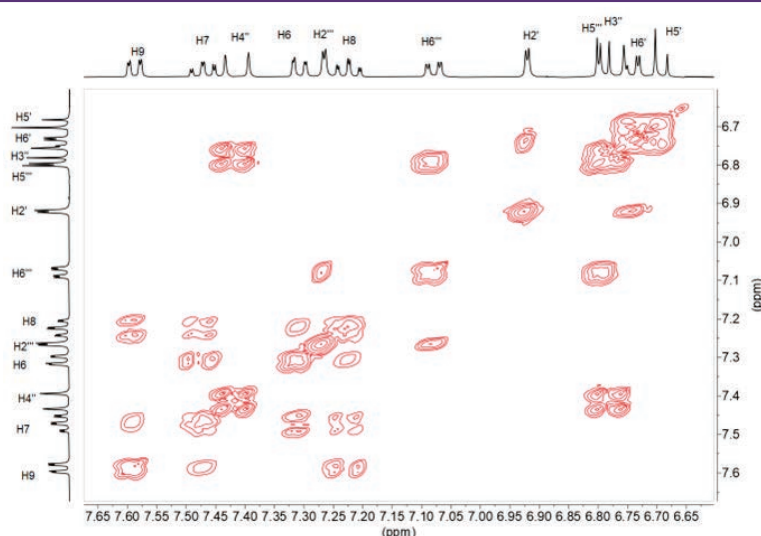


Figure 12.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum of compound 11 in  $\text{DMSO}-d_6$



and the  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  coupling constants, which agree with the values obtained from the  $^1\text{H}$  NMR spectra. In compound 9, the chemical shift is  $\delta = -135.8$  and the signal corresponds to a doublet of doublets due to the coupling of fluorine with the hydrogens in H2' and H5',  $^3J_{\text{H}2'} = 12.5$ ,  $^4J_{\text{H}5'} = 9.2$  Hz (Figure 16). In the solid-state it appears at  $-127.7/-130.7$ . In compound 10, the chemical shift is  $\delta = -136.7$  (ddd,  $^3J_{\text{H}5'} = 12.1$ ,  $^4J_{\text{H}2'} = 8.4$ ,  $^4J_{\text{H}6'} = 4.2$  Hz) (Figure 17). In the solid-state it appears at  $-136.7$ .

### 3. CONCLUSIONS

From the present work the following conclusions can be driven:

i) Benzothiazepines can be synthesized by reaction of *o*-aminothiophenol with curcumin and curcuminoid  $\beta$ -diketones, in methanol and in acetic acid.

ii) Both in methanol and in acetic acid, the  $\beta$ -diketones react as  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones through a Michael addition, affording the same structural type, a benzothiazepine with two pendant groups, an aryl group adjacent to the sulfur atom and a 1-phenylethanone adjacent to the NH of the seven membered ring.

iii) Reaction times, yields and isolation of the compounds depend on the reaction media. Long reaction times and easy isolation of the final compound occur in methanol; conversely, short reaction times and difficult purification of the benzothiazepines, plus the formation in some cases of benzothiazoles, take place in acetic acid.

iv) 1D and 2D Multinuclear NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) in solution and  $^{13}\text{C}$  NMR in solid state have proved to be essential to elucidate the structures and tautomerism of the benzothiazepines and benzothiazoles.

## 4. EXPERIMENTAL PART

### 4.1. General remarks

All reagents cited in the experimental procedure are commercial compounds. For thin-layer chromatography, Merck Kiesegel 60F254 chromatofolios with a fluorescence indicator on aluminum and a layer thickness of 0.2 mm were used. For column chromatography, Merck silica gel 60 (70-230 mesh) was used with the eluent indicated in each case. Melting points have been determined in capillary tube on a Gallekamp apparatus and are uncorrected.

### 4.2. NMR

*Solution NMR spectra* were recorded on a 9.4 Tesla Bruker spectrometer (400.13 MHz for  $^1\text{H}$ , 376.50 MHz for  $^{19}\text{F}$ , 100.62 MHz for  $^{13}\text{C}$  and 40.54 MHz for  $^{15}\text{N}$ ) at 300 K with a 5-mm inverse detection H-X probe equipped with a z-gradient coil, or with a QNP 5 mm probe ( $^{19}\text{F}$ ). Chemical shifts ( $\delta$  in ppm) are given from internal solvents:  $\text{CDCl}_3$  7.26 for  $^1\text{H}$  and 77.0 for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}-d_6$  2.49 for  $^1\text{H}$  and 39.5 for  $^{13}\text{C}$ . External references were used for  $^{15}\text{N}$  and  $^{19}\text{F}$ , nitromethane and  $\text{CFCl}_3$ . Coupling constants ( $J$  in Hz) are accurate to  $\pm 0.2$  Hz for  $^1\text{H}$ ,  $\pm 0.8$  Hz for  $^{19}\text{F}$  and  $\pm 0.6$  Hz for  $^{13}\text{C}$ .

Typical parameters for  $^1\text{H}$  NMR spectra were spectral width 3000-6000 Hz and pulse width 9.5  $\mu\text{s}$  at an attenuation level of 0 dB. Typical parameters for  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were spectral width 21 kHz, pulse width 10.6  $\mu\text{s}$  at an attenuation level of  $-6$  dB and relaxation delay 2 s. WALTZ 16 was used for broadband proton decoupling; the FIDs were multiplied by an exponential weighting ( $\text{lb} = 2$  Hz) before Fourier transformation. Typical parameters for  $^{19}\text{F}$ -NMR spectra were spectral width 55 kHz, pulse width 13.75  $\mu\text{s}$  at an attenuation level of  $-6$  dB and relaxation delay 1 s. In some cases, for resolution enhancement processing a gaussian multiplication of the FID prior to Fourier transformation was applied.

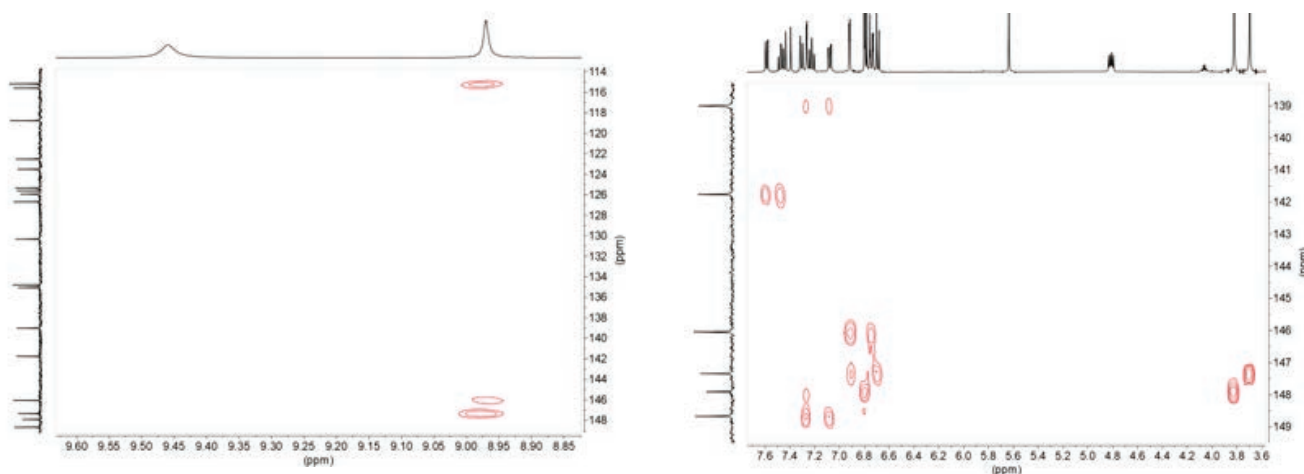


Figure 13.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum enhancement of compound 11 in  $\text{DMSO}-d_6$

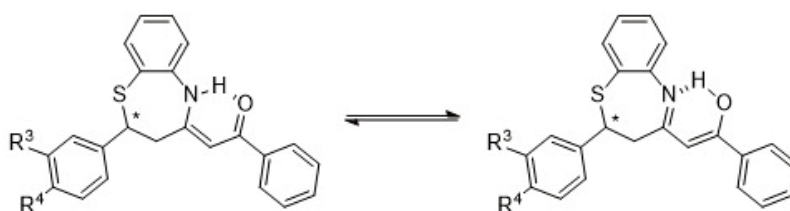


Figure 14. Ketoenamine-iminoenol tautomerism of synthesized benzothiazepines

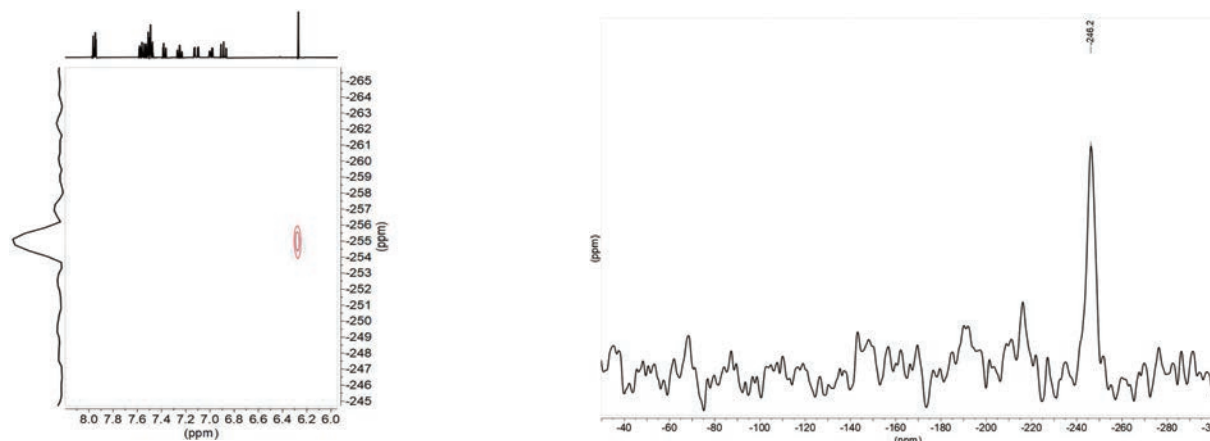


Figure 15.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC in  $\text{DMSO}-d_6$  and  $^{15}\text{N}$ -CPMAS NMR spectra of compound 9

2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) gs-COSY, ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) gs-HMQC, ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) gs-HMBC, ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) gs-HMQC and ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) gs-HMBC, were acquired and processed using standard Bruker NMR software and in non-phase-sensitive mode. Gradient selection was achieved through a 5% sine truncated shaped pulse gradient of 1 ms.

Selected parameters for ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) gs-HMQC and gs-HMBC spectra were: spectral width 3000-6000 Hz for  $^1\text{H}$  and 20 kHz for  $^{13}\text{C}$ , 1024 x 256 data set, number of scans 2 (HMQC) or 4 (HMBC) and relaxation delay 1s. In the gs-HMQC experiments GARP modulation of  $^{13}\text{C}$  was used for decoupling. The FIDs were processed using zero filling in the  $F_1$  domain and a sine-bell window function in both dimensions was applied prior to Fourier transformation.

Selected parameters for ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) gs-HMQC and gs-HMBC spectra were: spectral width 3000-6000 Hz for  $^1\text{H}$  and 15 kHz for  $^{15}\text{N}$ , 1024 x 1024 data set, number of scans 4, relaxation delay 1s. In the gs-HMBC delays of 27-200 ms for the evolution of the  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  long-range coupling were used. The FIDs were processed using zero filling in the  $F_1$  domain and a sine-bell window function in both dimensions was applied prior to Fourier transformation.

*Solid-state*  $^{13}\text{C}$  (100.73 MHz) and  $^{15}\text{N}$  (40.60 MHz) CPMAS NMR spectra have been obtained on a 9.4 Tesla Bruker spectrometer at 300 K (100.73 MHz for  $^{13}\text{C}$  and 40.60 MHz for  $^{15}\text{N}$ ) using a 4 mm DVT probehead. Samples were carefully packed in a 4-mm diameter cylindrical zirconia rotor with Kel-F end-caps. Operating conditions involved  $2.9\ \mu\text{s}$   $90^\circ$   $^1\text{H}$  pulses and decoupling SPINAL 64 sequence.

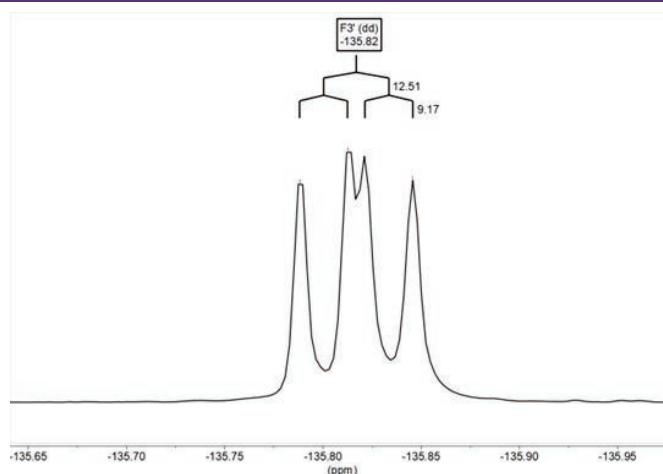


Figure 16.  $^{19}\text{F}$  NMR in  $\text{DMSO}-d_6$  of compound 9. The signal corresponds to a dd due to the coupling of fluorine with the hydrogens in  $\text{H}_2'$  and  $\text{H}_5'$  ( $J_{\text{H}_2'} = 12.5$ ,  $J_{\text{H}_5'} = 9.2$  Hz)



$^{13}\text{C}$  spectra were originally referenced to a glycine sample and then the chemical shifts were recalculated to the  $\text{Me}_4\text{Si}$  (for the carbonyl atom (glycine)  $\delta = 176.1$  ppm) and  $^{15}\text{N}$  spectra to  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  and then converted to nitromethane scale using the relationship:  $\delta^{15}\text{N}$  (nitromethane) =  $\delta^{15}\text{N}$  (ammonium chloride) – 338.1 ppm.

Typical acquisition parameters for  $^{13}\text{C}$ -CPMAS were: spectral width, 40 kHz; recycle delay, 5–60 s; acquisition time, 30 ms; contact time, 4 ms; and spin rate, 12 kHz. In order to distinguish protonated and unprotonated carbon atoms, the NQS (Non-Quaternary Suppression) experiment by conventional cross-polarization was recorded; before the acquisition the decoupler is switched off for a very short time of 25  $\mu\text{s}$  (23,24,25). For  $^{15}\text{N}$ , CPMAS were: spectral width, 40 kHz; recycle delay, 5–60 s; acquisition time, 35

ms; contact time, 7 ms; and spin rate, 6 kHz.

Solid-state  $^{19}\text{F}$  (376.94 MHz) NMR spectra have been obtained on a 9.4 Tesla using a MAS DVT BL2.5 X/F/H double resonance probehead. Samples were carefully packed in 2.5 mm diameter cylindrical zirconia rotors with Kel-F end-caps. Samples were spun at the magic angle at rates of 25 kHz and the experiments were carried out at ambient probe temperature.

The typical acquisition parameters  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$  MAS were: spectral width, 75 kHz; recycle delay, 10 s; acquisition time, 25 ms; pulse width, 2.5  $\mu\text{s}$  and proton decoupling field strength of 100 kHz by SPINAL-64 sequence; 128 scans. The  $^{19}\text{F}$  spectra were referenced to ammonium trifluoroacetate sample and then the chemical shifts were recalculated to the  $\text{CFCl}_3$  ( $\delta\text{CF}_3\text{CO}_2-\text{NH}_4^+ = -72.0$  ppm).

**Table 3.**  $^{13}\text{C}$  NMR parameters ( $\delta$  in ppm and J in Hz) of benzothiazepines 8-11

Atom	8			9		10			11	
	$\text{CDCl}_3$	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS	$\text{CDCl}_3$	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS
C2	55.4	54.6 $^1J=144.5$	55.1	53.6 $^1J=147.0$	55.2	54.9 $^1J=143.9$	53.9 $^1J=144.8$	54.0	54.3 $^1J=145.3$	53.6
C3	41.0	39.9 $^1J=132.5$	42.1	39.5 $^1J=132.5$	42.6 40.3	40.8 $^1J=132.1$	39.4	34.2	39.8	39.2
C4	161.3	161.65	163.1	161.4	164.1	160.8	161.4	163.7	160.2	165.1
C5a	142.1	141.6	141.1	141.6	141.0	142.1	141.7	141.0	141.8	141.7
C6	123.8	123.7 $^1J=162.7$ $^3J=8.0$ 130.3	124.3	123.8 $^1J=162.3$ $^3J=8.0$ 130.4	122.5	123.8 $^1J=183.7$ $^3J=8.6$ 130.3	123.8 $^1J=162.5$ $^3J=7.9$ 130.5	126.1	123.5 $^1J=163.9$ $^3J=7.9$ 130.3	121.3
C7	130.1	$^1J=161.5$ $^3J=8.5$ 126.2	128.8	$^1J=162.2$ $^3J=8.5$ 126.3	131.0	$^1J=163.0$ $^3J=8.1$ 126.1	$^1J=163.0$ $^3J=8.4$ 126.3	129.5	$^1J=163.7$ $^3J=9.2$ 125.9	130.5
C8	126.1	$^1J=162.4$ $^3J=7.5$ 135.1	126.0	$^1J=162.4$ $^3J=7.8$ 135.1	127.1	$^1J=160.9$ $^3J=8.3$ 135.3	$^1J=162.4$ $^3J=7.9$ 135.2	126.1	$^1J=161.4$ $^3J=7.9$ 135.0	128.1
C9	135.3	$^1J=164.0$ $^3J=8.0$	133.4	$^1J=163.9$ $^3J=8.7$	135.4	$^1J=162.4$ $^3J=8.5$	$^1J=163.8$ $^3J=7.8$	136.1	$^1J=163.1$ $^3J=7.5$	137.8
C9a	126.8	125.7	127.1	125.2	125.4	126.4	125.2	126.1	125.6	125.7
C1''	94.0	93.4 $^1J=162.8$	93.7	93.39 $^1J=163.3$	95.4	94.0	93.4 $^1J=162.4$	94.0	98.0 $^1J=163.9$	100.1
C2''	189.6	188.2	191.7	188.3	191.0 189.8	189.8	188.3	192.4	187.4	186.5
C3''	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	125.3 $^1J=156.0$	125.7
C4''	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	139.0 $^1J=153.5$	141.7
C1'	135.3	134.9 n.o.	137.3	135.4 $^3J_F=5.4$	136.9	139.7 $^4J_F=3.9$	140.8 $^4J_F=3.5$	141.0	134.8	135.8





		110.7		114.2	114.8	112.2	112.2		110.8	
C2'	109.4	<sup>1</sup> J=156.2 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=5.7	111.2	<sup>2</sup> J <sub>F</sub> =18.9, <sup>1</sup> J=162.7	113.8	<sup>3</sup> J <sub>F</sub> =2.1 <sup>1</sup> J=158.3	<sup>3</sup> J <sub>F</sub> =2.0	107.5	<sup>1</sup> J=156.2	111.9
C3'	146.5	147.3	146.6	150.6 <sup>1</sup> J <sub>F</sub> =241.1	152.1 149.9	147.7 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =10.7	146.9 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =10.7	146.9	147.3	146.6
OMe'	55.8	55.4 <sup>1</sup> J=144.3	57.6	-----		56.2 <sup>1</sup> J=144.7	55.8 <sup>1</sup> J=145.4	54.0	55.4 <sup>1</sup> J=145.0	57.1
C4'	145.4	146.0		144.2 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =12.1	146.5 145.0	152.0 <sup>1</sup> J <sub>F</sub> =246.8	150.7 <sup>1</sup> J <sub>F</sub> =244.0	152.4 149.9	146.0	146.6
C5'	114.3	115.15 <sup>1</sup> J=158.6 <sup>3</sup> J=4.0	116.0	117.6 <sup>3</sup> J <sub>F</sub> =3.2, <sup>1</sup> J=161.8	118.7 115.9	116.0 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =18.7	115.7 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =18.1	116.7	115.2 <sup>1</sup> J=158.1	115.4
C6'	119.6	118.7 <sup>1</sup> J=159.3 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=5.5	118.9	122.6 <sup>4</sup> J <sub>F</sub> =3.1 <sup>1</sup> J=164.1	122.5	119.0 <sup>3</sup> J <sub>F</sub> =6.9 <sup>1</sup> J=167.2	118.5 <sup>3</sup> J <sub>F</sub> =6.9	121.3	118.8 <sup>1</sup> J=163.1	117.8
Cl	139.6	139.1	138.3	139.1	139.5	139.6	139.1 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=6.9	141.0	126.7	
Co	127.2	127.0 <sup>1</sup> J=160.5 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=6.6	126.0	127.0 <sup>1</sup> J=161.2 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=7.5	125.4	127.2 <sup>1</sup> J=159.8 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=6.8	127.0 <sup>1</sup> J=153.7 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=6.7	126.1	-----	
Cm	128.4	128.4 <sup>1</sup> J=160.7 <sup>3</sup> J=7.5	127.1	128.5 <sup>1</sup> J=161.9 <sup>3</sup> J=7.4	131.0	128.4 <sup>1</sup> J=160.7 <sup>3</sup> J=7.4	128.5 <sup>1</sup> J=148.2 <sup>3</sup> J=7.1	126.1	-----	
Cp	131.3	131.4 <sup>1</sup> J=161.7 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=7.1	132.1	131.5 <sup>1</sup> J=161.4 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=7.6	131.0	131.4 <sup>1</sup> J=160.5 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=7.7	131.5 <sup>1</sup> J=161.3 <sup>3</sup> J= <sup>3</sup> J=7.8	131.3	-----	
C1'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	126.7	129.4
C2'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	110.9 <sup>1</sup> J=160.7	111.9
C3'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	147.9	147.9
C4'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	148.7	147.9
C5'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	115.6 <sup>1</sup> J=158.1	117.8
C6'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	122.5 <sup>1</sup> J=158.4	119.0
OMe'''	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	55.6 <sup>1</sup> J=144.4	57.1

General procedure for the synthesis of curcuminoid  $\beta$ -diketones.

First 20 mmol of 1-phenylbutane-1,3-dione, and then 20 mmol of boric anhydride, were dissolved in 20 ml anhydrous ethyl acetate in a three-neck round-bottom flask equipped with a reflux condenser and magnetic stirring; the mixture being stirred for 90 min at room temperature (25°C).

Thereafter, using an addition funnel, a mixture formed by 20 mmol of the corresponding starting aldehyde [vanillin (1) for the diketone 4, 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde (2) for the diketone 5, and 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (3) for the diketone 6] and 40 mmol of tributylborate dissolved in anhydrous ethyl acetate (30 ml) was added and left stirring at room temperature for 60 min. Then, 2 ml of *n*-butylamine were added dropwise over 5 min and

the resulting mixture was stirred at room temperature for 20 h. To hydrolyze the formed boron complex, 30 ml of 0.4 M HCl were added to the reaction mixture previously heated to 80 °C, and continuous stirring at such temperature was maintained for 60 min. After cooling for 30 min, the organic phase was separated from the aqueous phase. The aqueous phase was extracted with (3 x 15 ml) of ethyl acetate and the organic phases washed with (2 x 10 ml) of water and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure, using a rotary evaporator, and the crude purified by column chromatography and/or crystallization.

5-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-4-penten-1,3-dione (4). The reaction crude was treated with 100 ml of 2M HCl, forming a precipitate that was filtered; the solid obtained was recrystallized using hot methanol with a few drops of

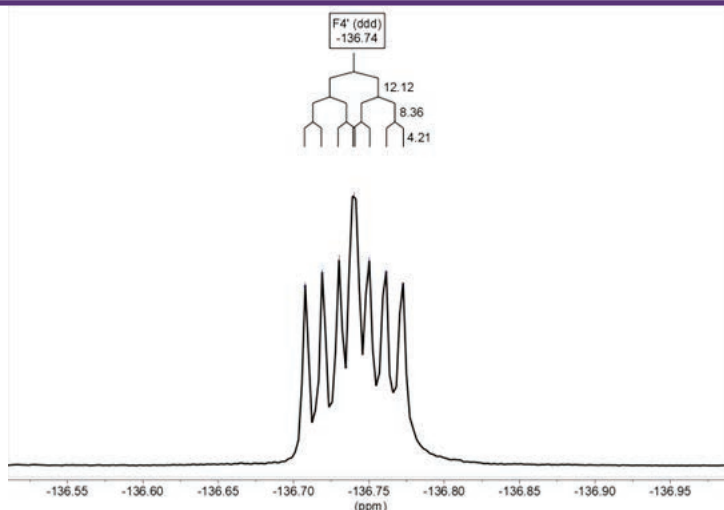


Figure 17.  $^{19}\text{F}$  NMR of compound 10 in  $\text{DMSO}-d_6$ :  $\delta = -136.74$  (ddd,  $^3J_{\text{H}_5'} = 12.1$ ,  $^4J_{\text{H}_2'} = 8.4$ ,  $^4J_{\text{H}_6'} = 4.2$  Hz)

dichloromethane. In this way compound 4 with a yield of 45% was obtained. M.p. (MeOH): 195.8°C [lit. 198 °C (16)].

5-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-4-penten-1,3-dione (5). The reaction crude was treated with 100 ml of 2M HCl, forming a precipitate that was filtered; the solid obtained was recrystallized using hot methanol with a few drops of chloroform. Compound 5 was obtained as an orange crystalline solid, with a yield of 62.2%. M.p. (MeOH): 192.8°C [lit. 193.3 °C (16)].

5-(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)-1-phenyl-4-penten-1,3-dione (6). The reaction crude was purified by column chromatography, eluting with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (99:1). Further purification was achieved using hot methanol and chloroform to give a light orange crystalline solid, 6, in 32.4% yield. M.p. (MeOH): 126.5°C [lit. 127.2 °C (16)].

General procedure for the reaction of curcuminoid diketones with *o*-aminothiophenol in methanol.

2 Mmol of the corresponding diketone was dissolved in 30 ml of methanol, and subsequently a solution of 4 mmol of *o*-aminothiophenol in 5 ml of methanol (b.p. 64.7 °C) was slowly added. The reaction was heated under reflux with magnetic stirring for 5.5 h. After that time, heating was stopped and the stirring was continued for another 15 h at room temperature (25 °C). We concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator. The crude product was purified by means of one or more chromatographic columns, and subsequent recrystallization.

2-[2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene]-1-phenylethanone (8). The reaction crude is successively chromatographed, eluting with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  95:5; to isolate the product which is purified by recrystallization from hot methanol, obtaining a light yellow crystalline solid (yield 43%). M.p. (MeOH): 163.1 °C. Anal. Calc. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{S}$ : C, 71.44; H, 5.25; N, 3.47. Found: C, 71.52; H, 5.50; N, 3.18.

2-[2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene]-1-phenylethanone (9). The reaction crude is successively chromatographed, eluting with Hex/AcOEt 9:3; finally we recrystallized in hot methanol and chloroform (yield. 52%). M.p. (MeOH): 196.3 °C. Anal. Calc. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FNO}_2\text{S}$ : C, 70.57; H, 4.63; N, 3.58. Found: C, 70.49; H, 4.61; N, 3.70. Found: C, 70.79; H, 4.29; N, 3.58.

2-[2-(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene]-1-phenylethanone (10). The reaction crude is successively chromatographed eluting with Hex/AcOEt 9:3 and recrystallized from hot methanol (yield 69.4%). M.p. (MeOH): 163.4 °C. Anal. Calc. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FNO}_2\text{S}$ : C, 71.09; H, 4.97; N, 3.45. Found: C, 70.88; H, 5.02; N, 3.44.

4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene)but-3-en-2-one (11). The crude is purified after several chromatographic columns eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  in different proportions (9:1, 95:5 and 9:3), and the final product is recrystallized from hot methanol and chloroform (yield 53.9%). M.p. (MeOH): 181.5 °C. Anal. Calc. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{S}$ : C, 68.19; H, 5.30; N, 2.95. Found: C, 68.23; H, 5.22; N, 3.01.

General procedure for the reaction of curcuminoid diketones with *o*-aminothiophenol in acetic acid.

In a three-neck flask equipped with a reflux condenser and magnetic stirring, 1 mmol of the corresponding diketone was dissolved in 12 ml of commercial glacial acetic acid. Then a solution of 2 mmol of *o*-aminothiophenol in 1 ml of glacial acetic acid was slowly added. The reaction mixture was heated at 80 °C with magnetic stirring for 2 h. After this time, the reaction was stopped, either allowing it to cool to room temperature and concentrating using a rotary evaporator, or pouring the crude oil onto ice and afterwards extracting or filtering. Other attempts with longer reaction times afforded lower yields in all cases.



2-[2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene]-1-phenylethanone (8). Starting from diketone 4, the reaction crude poured onto ice, extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and then column chromatographed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Finally, benzothiazepine 8 was recrystallized from methanol (43% yield). M.p. (MeOH): 163.1 °C.

2-[2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene]-1-phenylethanone (9). Starting from diketone 5, the reaction crude poured onto ice. The solid obtained was filtered and purified by column chromatography using hexane/AcOEt (9:3) as eluent. Finally, benzothiazepine 9 was recrystallized from methanol (40% yield). M.p. (MeOH): 196.3 °C.

2-[2-(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene]-1-phenylethanone (10). Starting from diketone 6, the reaction was stopped pouring the crude onto ice, then extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , concentrated on a rotary evaporator and recrystallized from methanol, benzothiazepine 10 (48% yield) was obtained. M.p. (MeOH): 163.4 °C. Anal. Calc for  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{FNOS}$  C, 67.35; H, 4.24; N, 4.91. Found: C, 67.22; H, 4.31; N, 4.88.

4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-4(5H)-ylidene)but-3-en-2-one (11). Starting from diketone 7, the reaction crude was poured onto ice, extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and concentrated on a rotary evaporator. It was purified by column chromatography using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (95:5) as eluent and recrystallized from methanol (21% yield). M.p. (MeOH): 181.5 °C.

## Acknowledgements

We are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2014-56833-R), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PID2021-125207NB-C32) and to the Master "Ciencia y Tecnología Química" of the UNED for financial support.

## Supporting Information

NMR spectra in solution (Figures S1 to S46) and NMR spectra in solid state (Figures S47 to S56).

## ORCID

Dionisia Sanz <https://orcid.org/0000-0001-9672-4684>

Rosa M. Claramunt <https://orcid.org/0000-0001-6634-2677>

José Elguero <https://orcid.org/0000-0002-9213-6858>

## 5. REFERENCIAS

1. Zamani, F, Doustkhah E, Luque R. Structural features of 1,5-benzodiazepines and 1,5-benzothiazepines, Chapter 6 In book: Benzodiazepine-Based Drug Discovery, pages 183-199, 2022.

2. Mehmood R, Mughal EU, Elkaeed EB, et al. 2022, Synthesis of novel 2,3-dihydro-1,5-benzothiazepines as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: in vitro, in vivo, kinetic, SAR, molecular docking, and QSAR studies, ACS Omega, 7:30215–30232.

3. Zhu, GY, Zhou JJ, Liu, LG, et al. 2022, Catalyst-dependent stereospecific [3,3]-sigmatropic rearrangement of sulfoxide-ynamides: divergent synthesis of chiral medium-sized N,S-heterocycles, Angew Chem Int Ed., 61:e202204603.

4. Pinate P, Makone S. 2022, Synthesis and study of catalytic perspectives of DABCO based ionic liquid for the synthesis of 2,3-dihydro-1,5-benzothiazepines and 2-phenylbenzo-thiazoles, Catal Lett., in press. <https://doi.org/10.1007/s10562-022-04033-z>

5. Sarhan AE, Sediek AA, Khalifa NM, et al. 2022, Novel pyrazolines and benzothiazepines as tubulin polymerization inhibitors: synthesis, biological evaluation, and molecular docking, Heterocycles, 104: 447–469.

6. Haroun M, Chobe SS, Rajasekhar RA, et al. 2022, 1,5-Benzothiazepine derivatives: green synthesis, in silico and in vitro evaluation as anticancer agents, Molecules, 27:3757.

7. Shabir, G.; Shafique, I.; Saeed, A. 2022, Ultrasound assisted synthesis of 5–7 membered heterocyclic rings in organic molecules, J Heterocycl Chem., 59:1669-1702

8. González-Albadalejo J, Sanz D, Claramunt RM, et al. (2015) Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. An Real Acad Farm., 81:278–310.

9. Nigam S, Joshi YC, 2003, Synthesis of novel derivatives of 1,5-benzothiazepines, Phosphorus Sulfur Silicon, 178:1583–1586.

10. Kumari N, Saini RK, Joshi YC, 2007, Synthesis and novel derivative of 1,5-benzothiazepines from 1,3-diketones and their antibacterial activity, Oriental J Chem., 23:2.

11. Chhakra S, Mukherjee A, Singh HL, et al. 2019, Synthesis of novel substituted 1,5-benzothiazepines containing 1,4-benzodioxane sulfonyl moiety, Asian J Org Med Chem., 4:70–76.

12. Deshmukh R, Shinde V, Kanase DA, 2021, Review on 1,5-benzothiazepines as a versatile pharmacophore, J Emerging Technol Innovative Res., 8:2109333.

13. Nieto CI, Cornago MP, Cabildo MP, et al. 2018, Evaluation of the antioxidant and neuroprotectant activities of new asymmetrical 1,3-diketones, Molecules, 23:1837 (27 pages).14

14. Pabon HJJ. 1964, A synthesis of curcumin and related compounds, Recl Trav Chim Pays-Bas, 83:379.

15. Claramunt RM, Bouissane L, Cabildo MP, et al. 2009, Synthesis and biological evaluation of curcuminoid pyrazoles as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease: effect on matrix metalloproteinases. Bioorg Med Chem., 17:1290–1296.

16. Cornago P, Cabildo P, Sanz D, et al. 2013, Structures of hemi-curcuminoids in the solid state and in solution, Eur J Org Chem., 6043–6054.



17. Nieto CI, Cabildo P, Claramunt RM, et al. 2016, The structure of  $\beta$ -diketones related to curcumin determined by X-ray crystallography, NMR (solution and solid state) and theoretical calculations. *Struct Chem.*, 27:705–730.
18. Nieto CI, Andrade A, Sanz D, et al. 2017, Curcumin related 1,4-diazepines: regioselective synthesis, structure analysis, tautomerism, NMR spectroscopy, X-ray crystallography, density functional theory and GIAO calculations, *ChemistrySelect*, 2:3732–2738.
19. Nieto CI, Sanz D, Claramunt RM, et al. 2018, Molecular structure in the solid state by X-ray crystallography and SSNMR and in solution by NMR of two 1,4-diazepines; *J Mol Struct.*, 1155:205-214.
20. Sanz D, Nieto C, Claramunt, RM, et al. 2015, A multinuclear magnetic resonance study of fluoro derivatives of hydroxybenzaldehydes, *Magn Reson Chem.*, 53:624–631.
21. Prakash O, Kumar A, Sadana A, et al., 2005, Study of the reaction of chalcone analogs of dehydroacetic acid and *o*-aminothiophenol: synthesis and structure of 1,5-benzothiazepines and 1,4-benzothiazines, *Tetrahedron*, 61:6642–6651.
22. Martin GJ, Martin ML, Gouesnard JP, *15N-NMR Spectroscopy, NMR Basic Principles and Progress (NMR, volume 18)*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1981.
23. Murphy PD, 1983, Improvement in the cross-polarization NMR experiment for suppression of rigid protonated carbons, *J Magn Reson.*, 52:343–345.
24. Murphy PD, 1985, Pulse sequences for the selective observations of nonprotonated and methyl carbon NMR resonances in solids, *J Magn Reson.*, 62:303–308.
25. Alemany LB, Grant DM, Alger TD, et al., 1983, Cross polarization and magic angle sample spinning NMR spectra of model organic compounds. 3. Effect of the  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction on cross polarization and carbon-proton dephasing, *J Am Chem Soc.*, 105:6697–6704.

Si desea citar nuestro artículo:

**Reactivity of curcumin and curcuminoid  $\beta$ -diketones with *o*-aminothiophenol: synthesis of 1,5-benzothiazepines**

Carlos A. Martínez, Dionisia Sanz, Rosa M. Claramunt, José Elguero

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 351-367

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.02>







For

**Reactivity of curcumin and curcuminoid  $\beta$ -diketones with *o*-aminothiophenol: 1,5-Benzothiazepines**

**Carlos A. Martínez<sup>1</sup>, Dionisia Sanz<sup>1</sup>, Rosa M. Claramunt<sup>1</sup>, José Elguero<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica, Facultad de Ciencias, UNED, Avenida Esparta s/n, E-28232 Las Rozas-Madrid, Spain

<sup>2</sup> Instituto de Química Médica, CSIC, Juan de la Cierva, 3. E-28006 Madrid, Spain

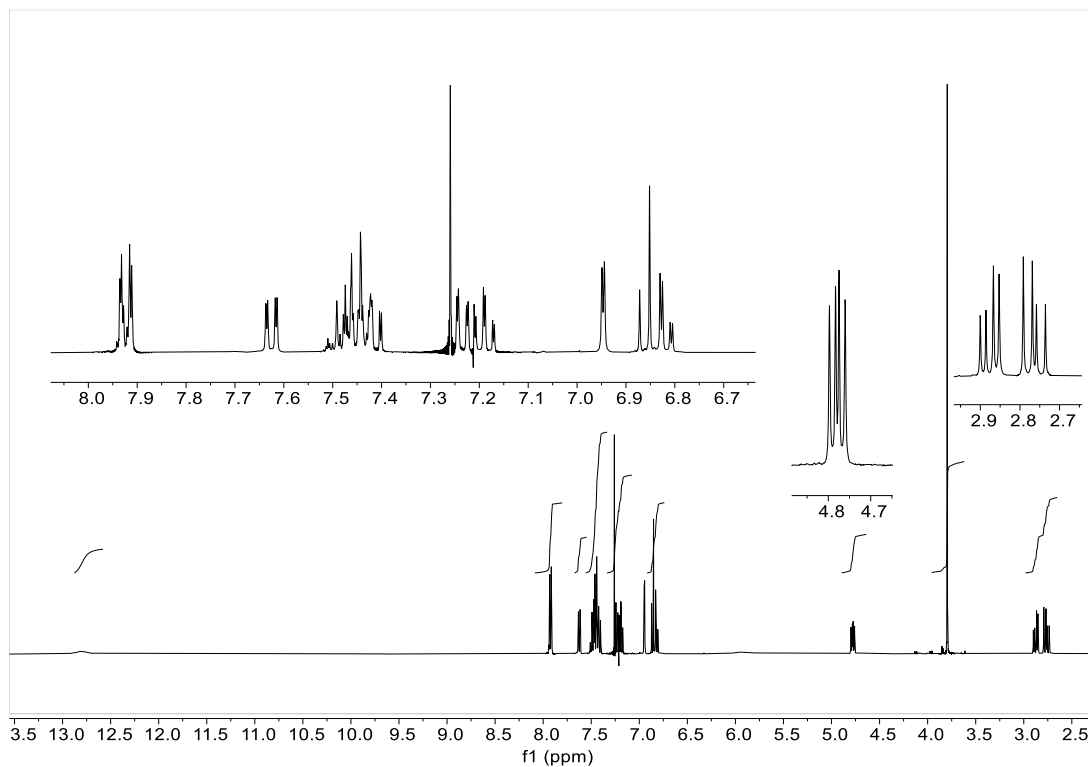
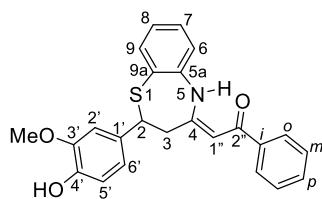
**Table of Contents**

1. NMR spectra in solution, Figures S1- S46
2. NMR Spectra in solid state, Figures S47-S56

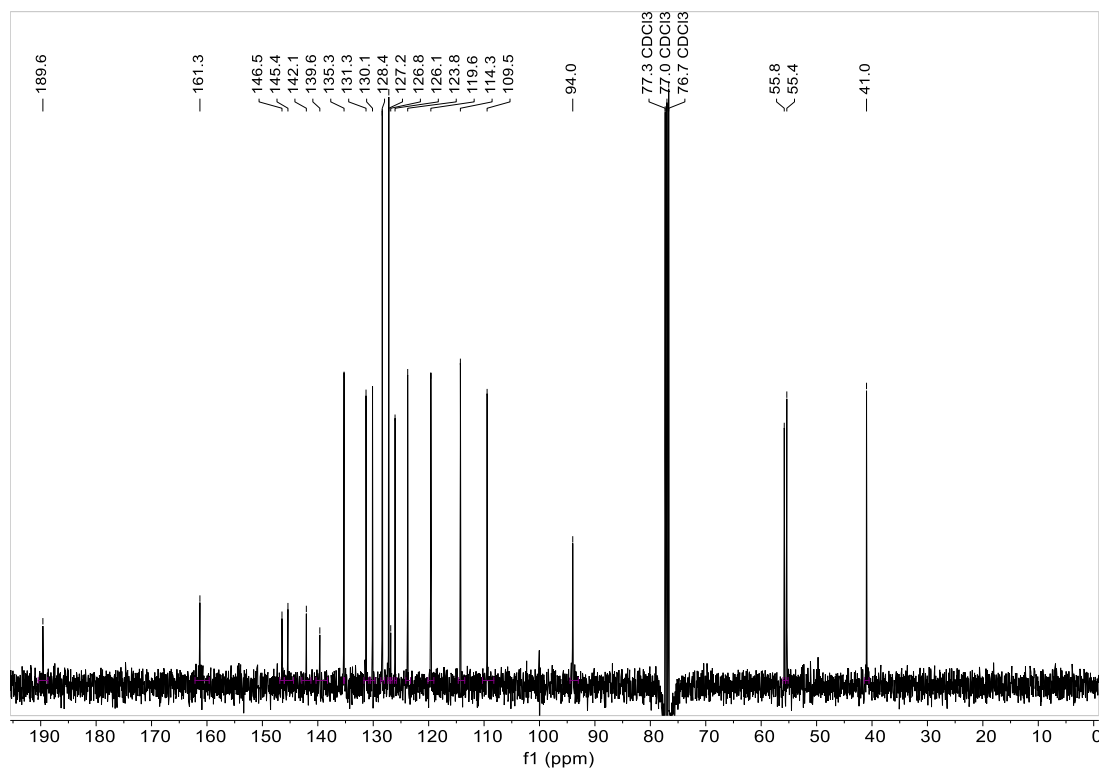


8

(benzotiazepinas-CME/benzotiazepina MeOH vainillina, disulfuro)



**Figure S1:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$



**Figure S2:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

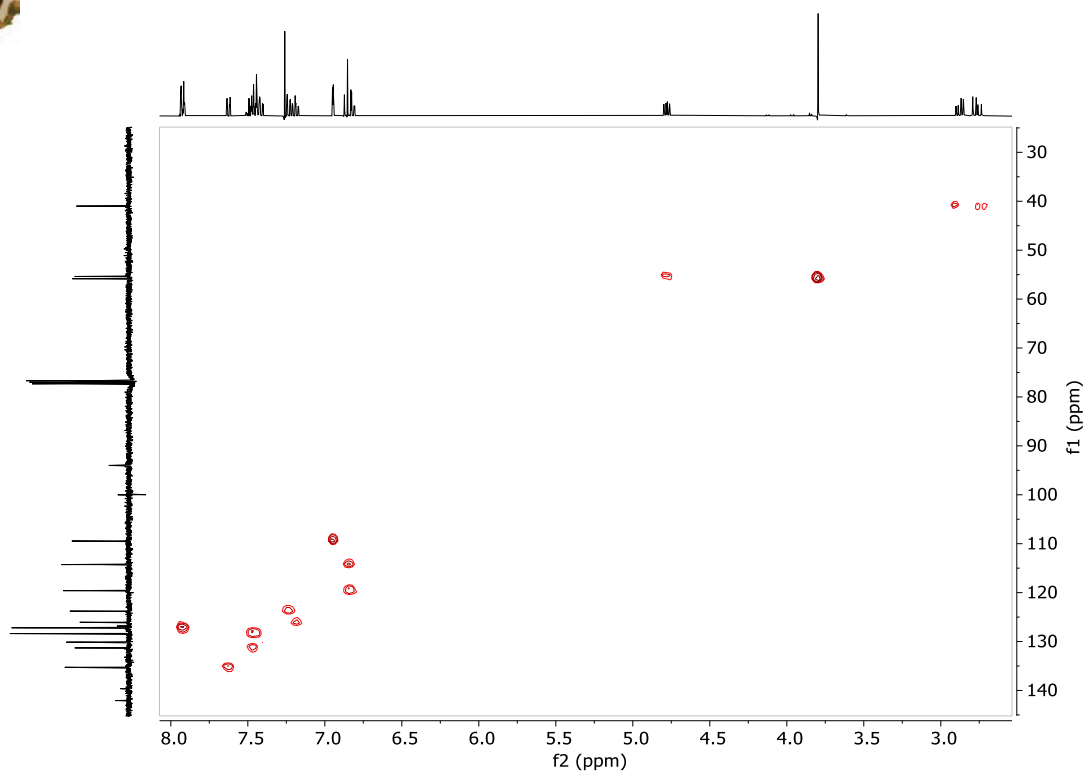


Figure S3:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

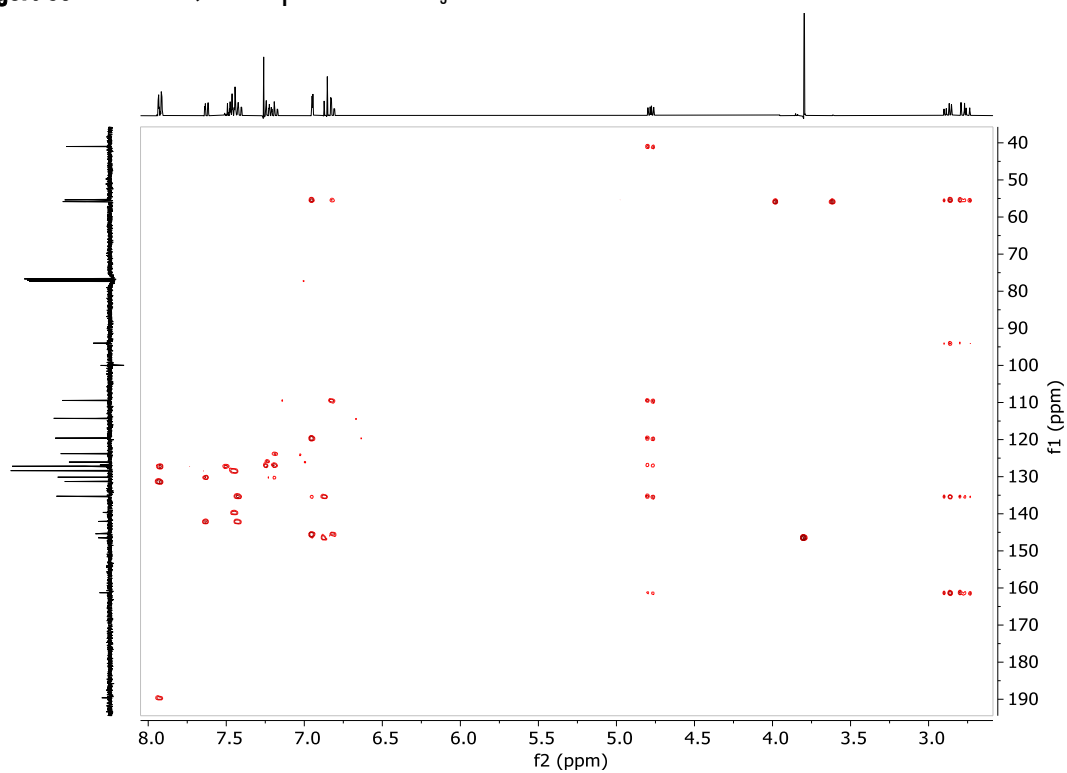


Figure S4:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

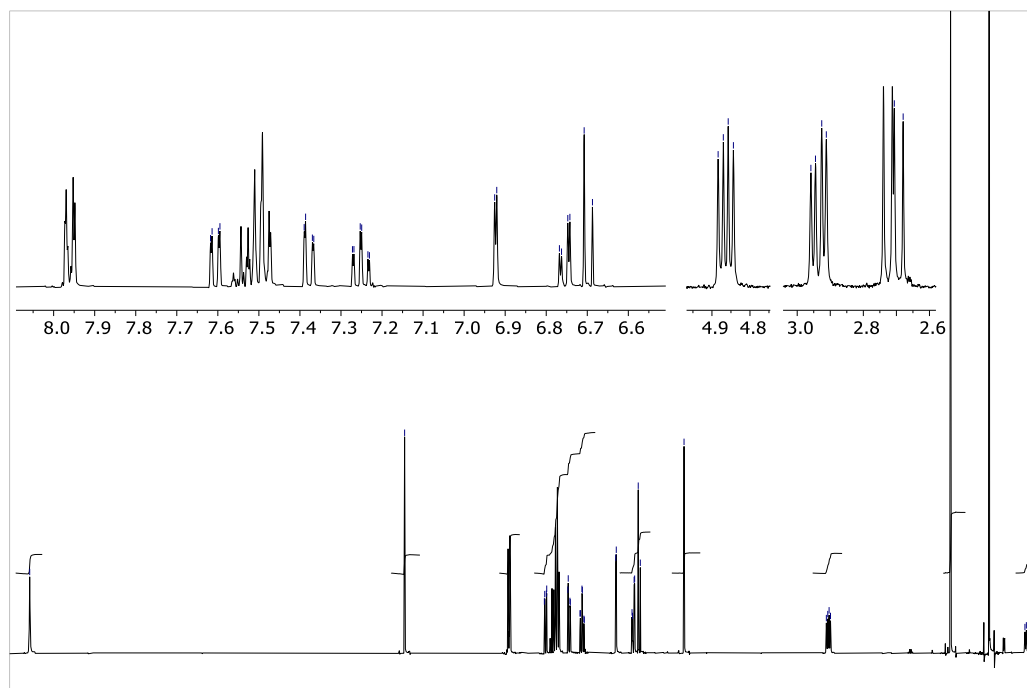


Figure S5:  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

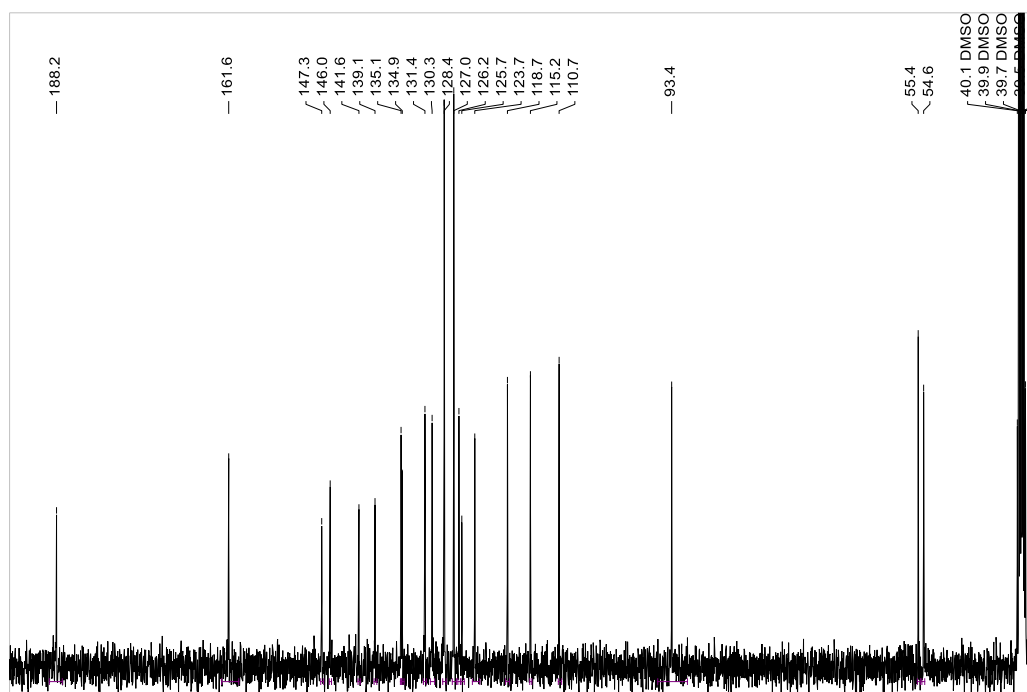


Figure S6:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

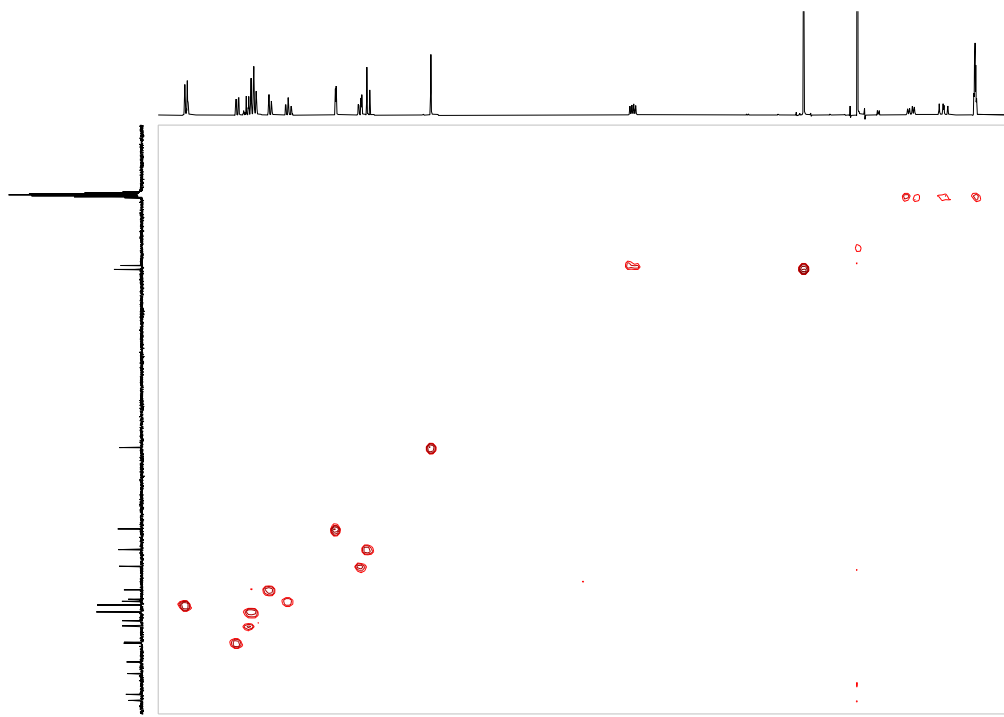


Figure S7:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

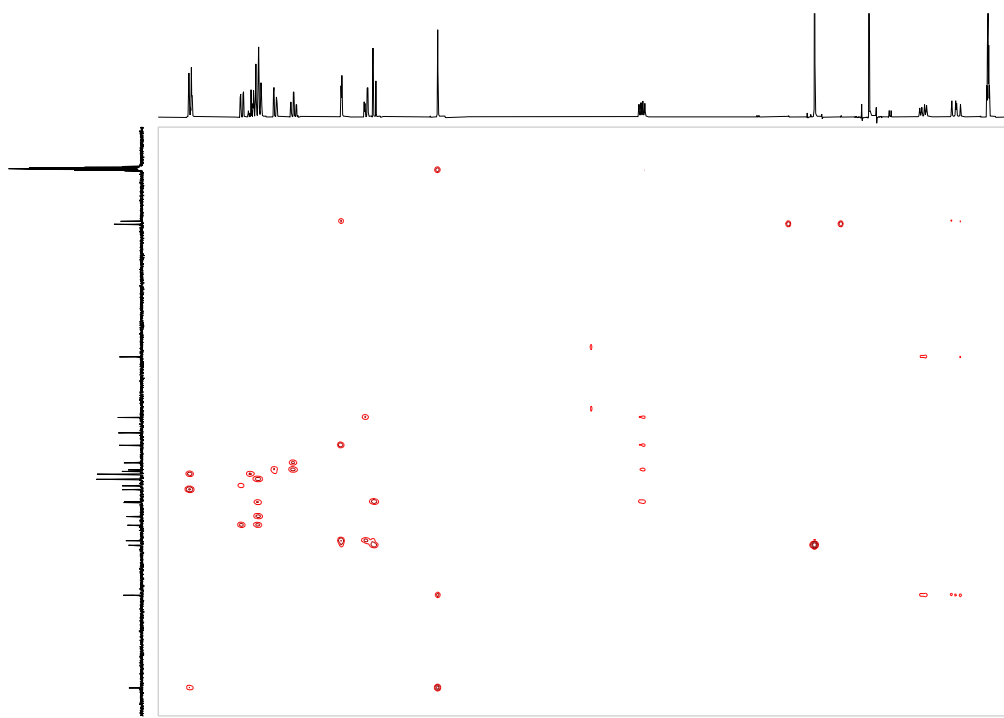
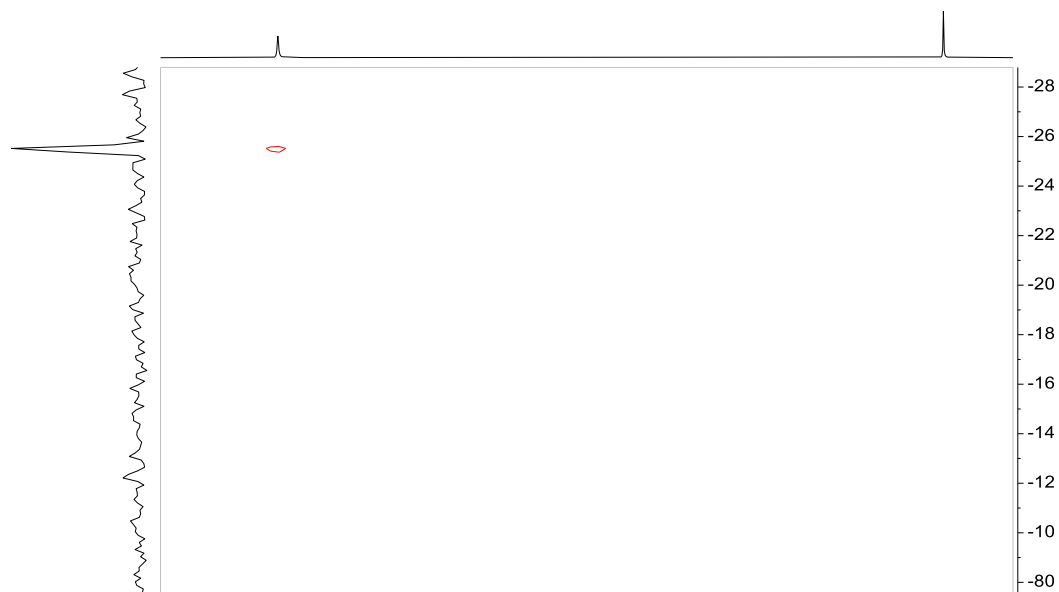
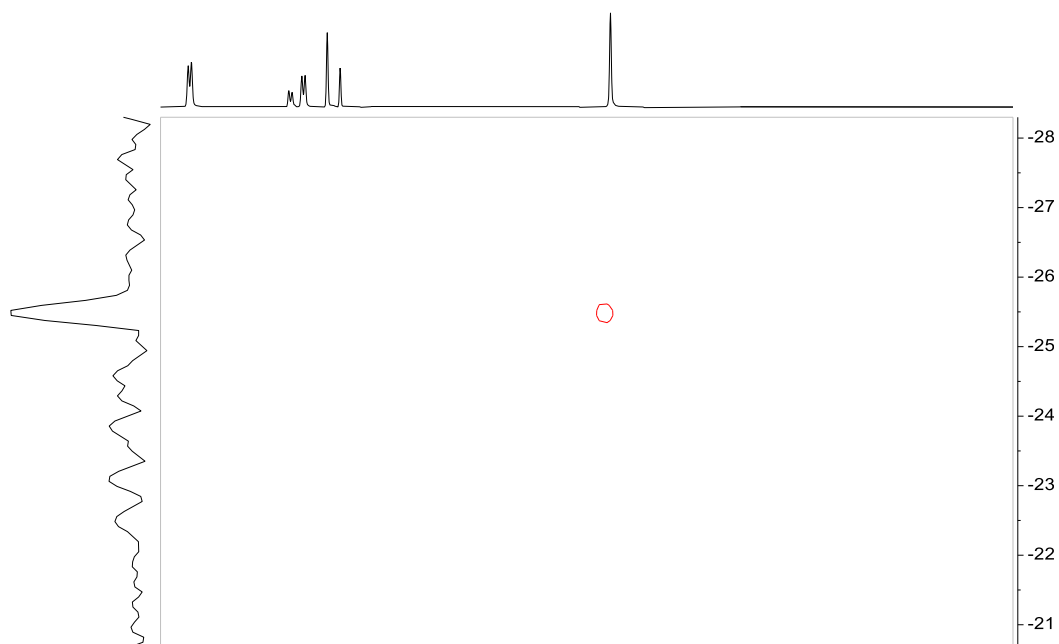


Figure S8:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

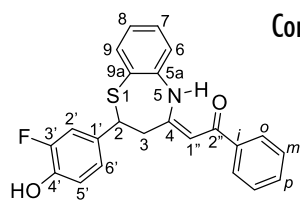




**Figure S9:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{N}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$



**Figure S10:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{N}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$



Compound 9 (CME-8)

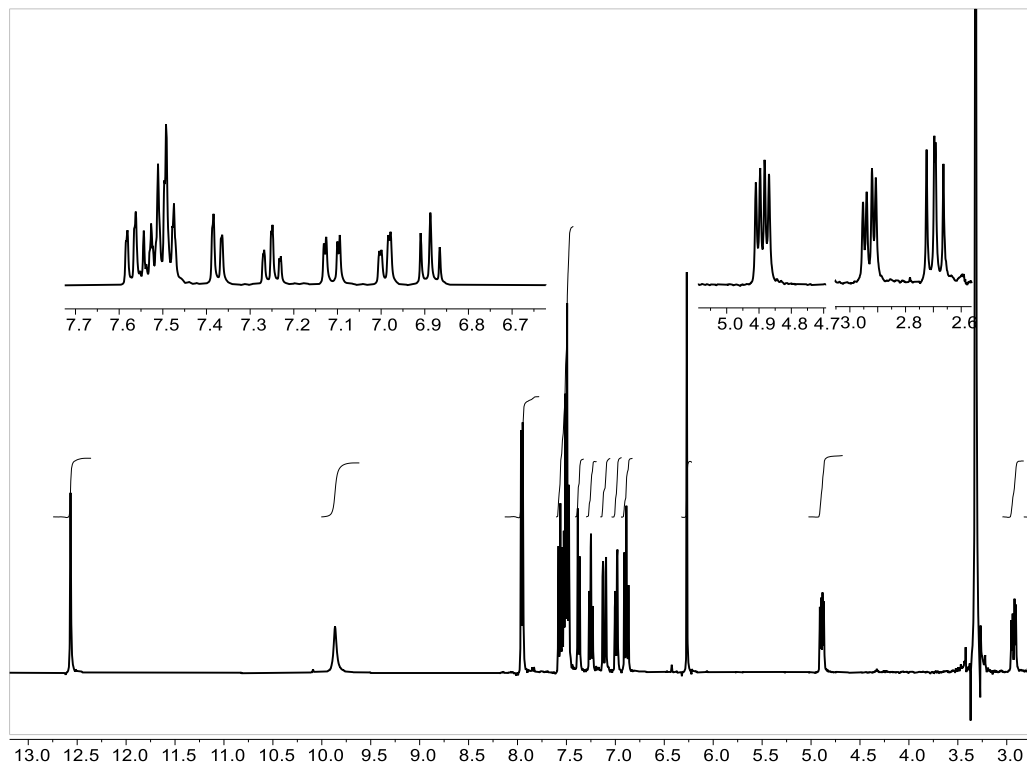


Figure S11: <sup>1</sup>H NMR spectrum in DMSO-*d*<sub>6</sub>

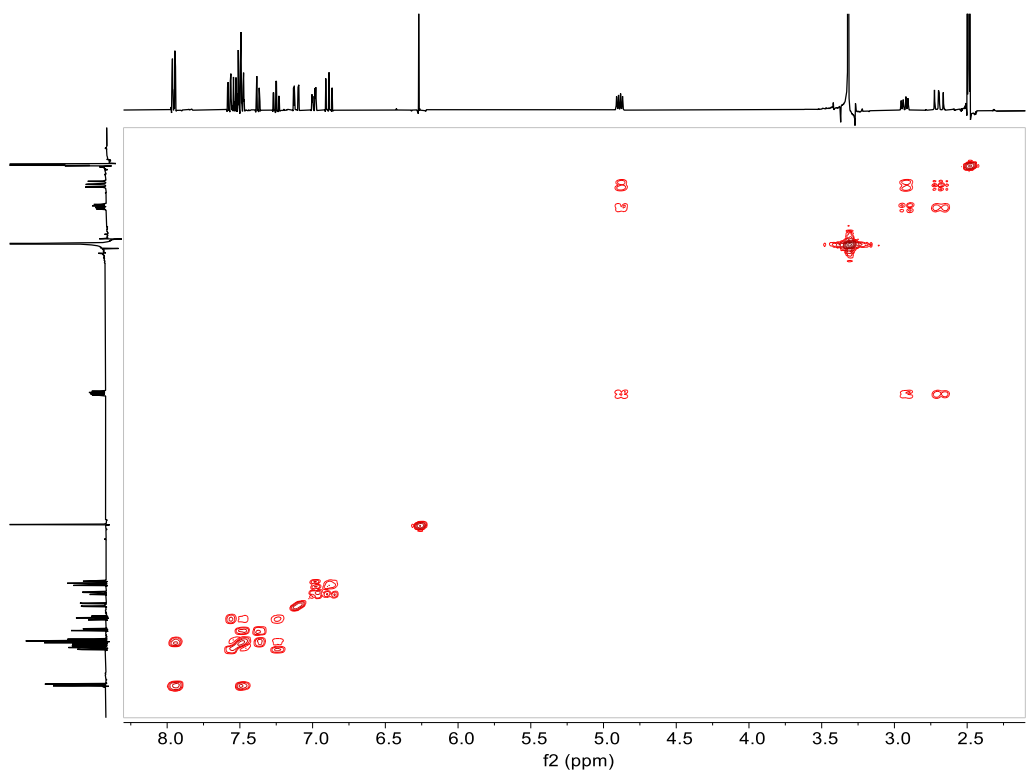


Figure S12: <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR spectrum in DMSO-*d*<sub>6</sub>

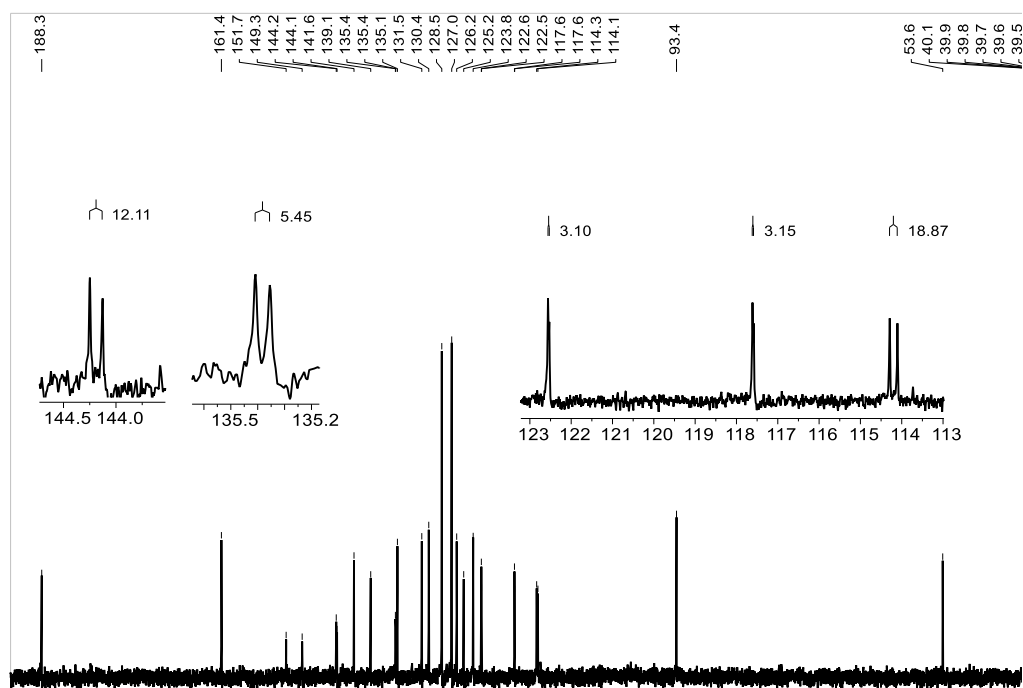


Figure S13:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

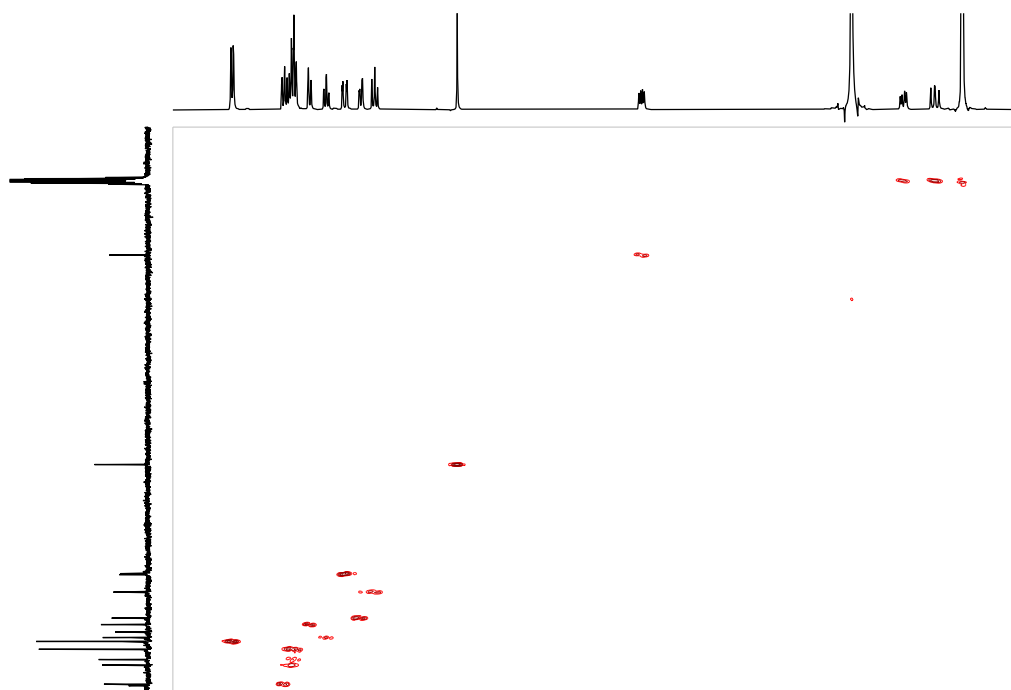


Figure S14:  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

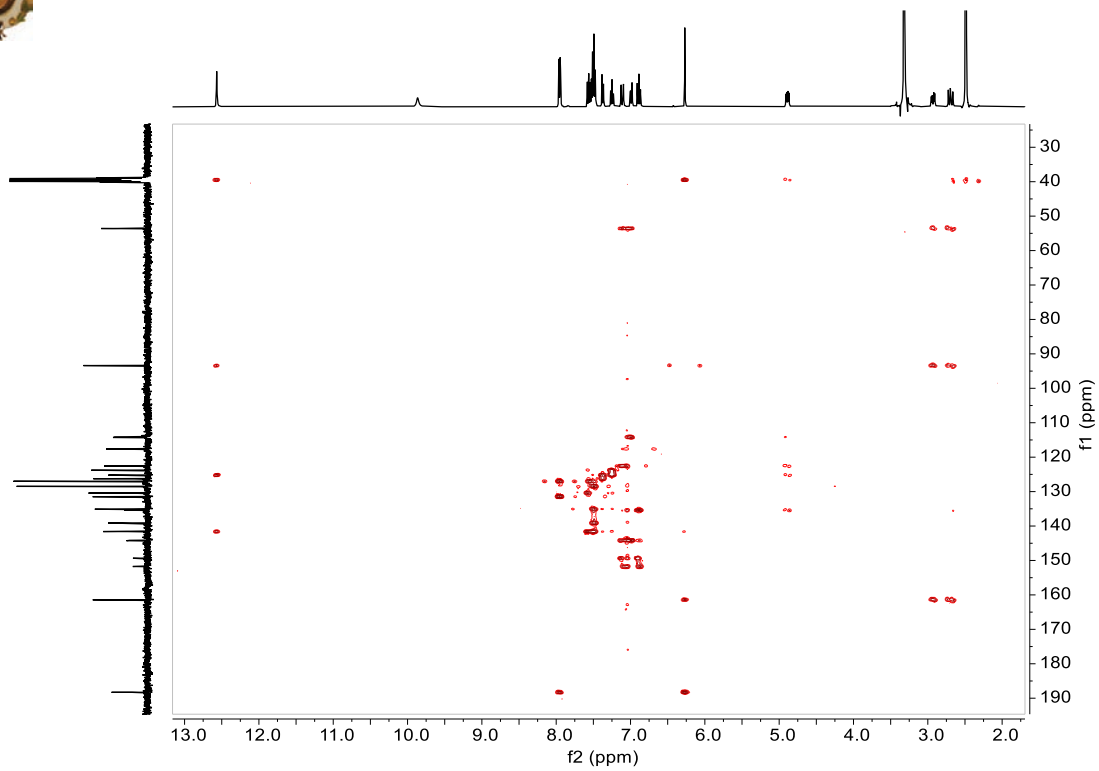


Figure S15:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

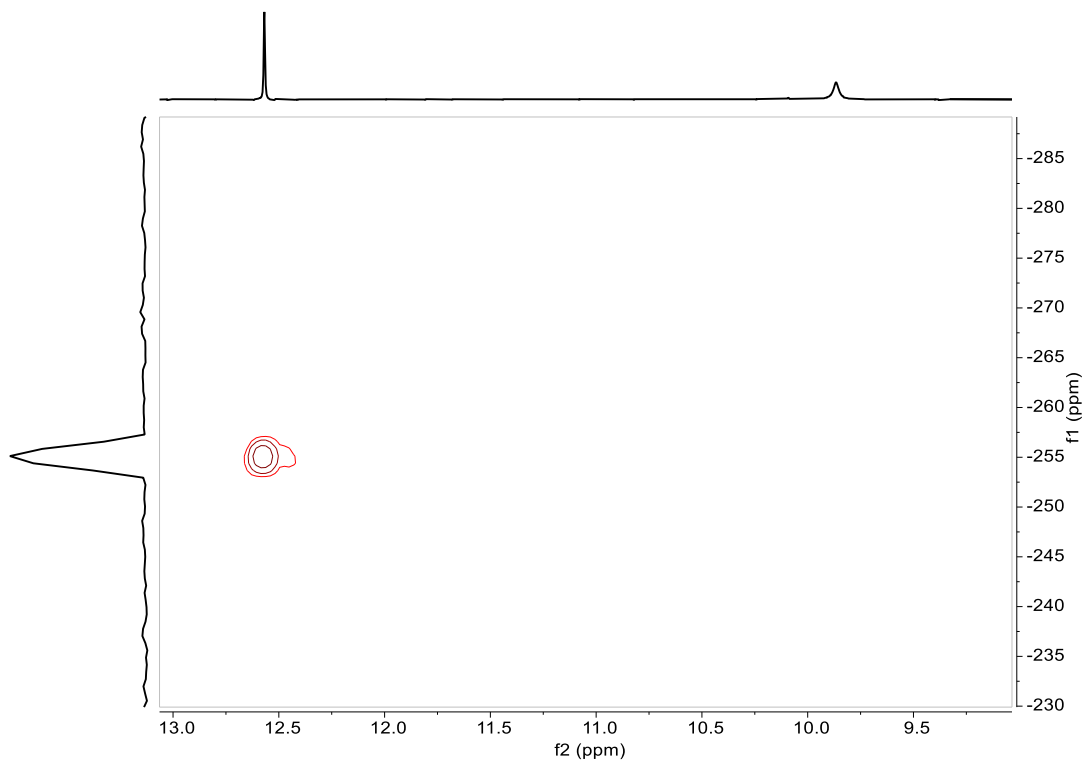


Figure S16:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

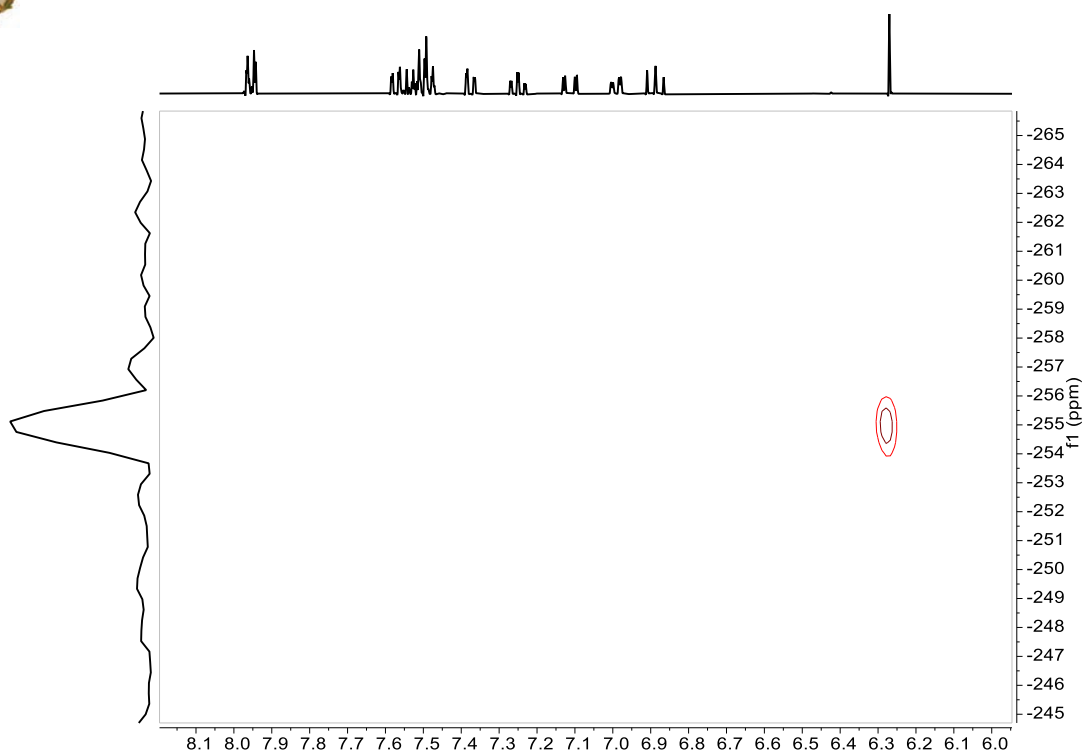


Figure S17:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

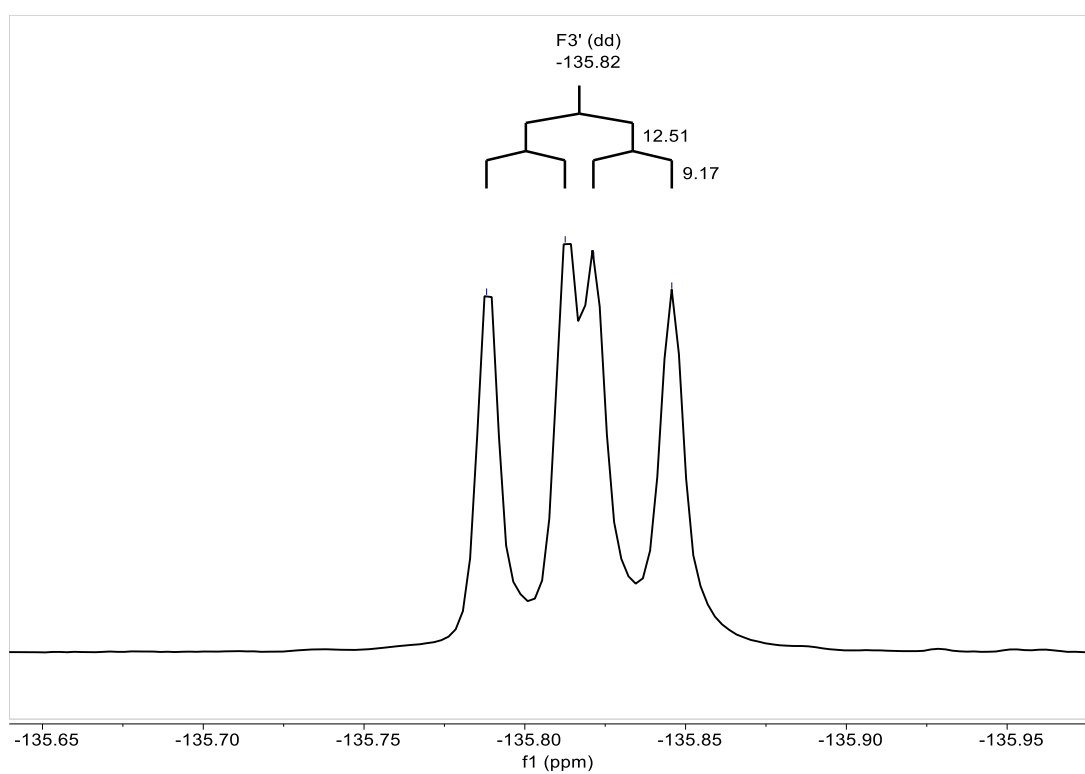
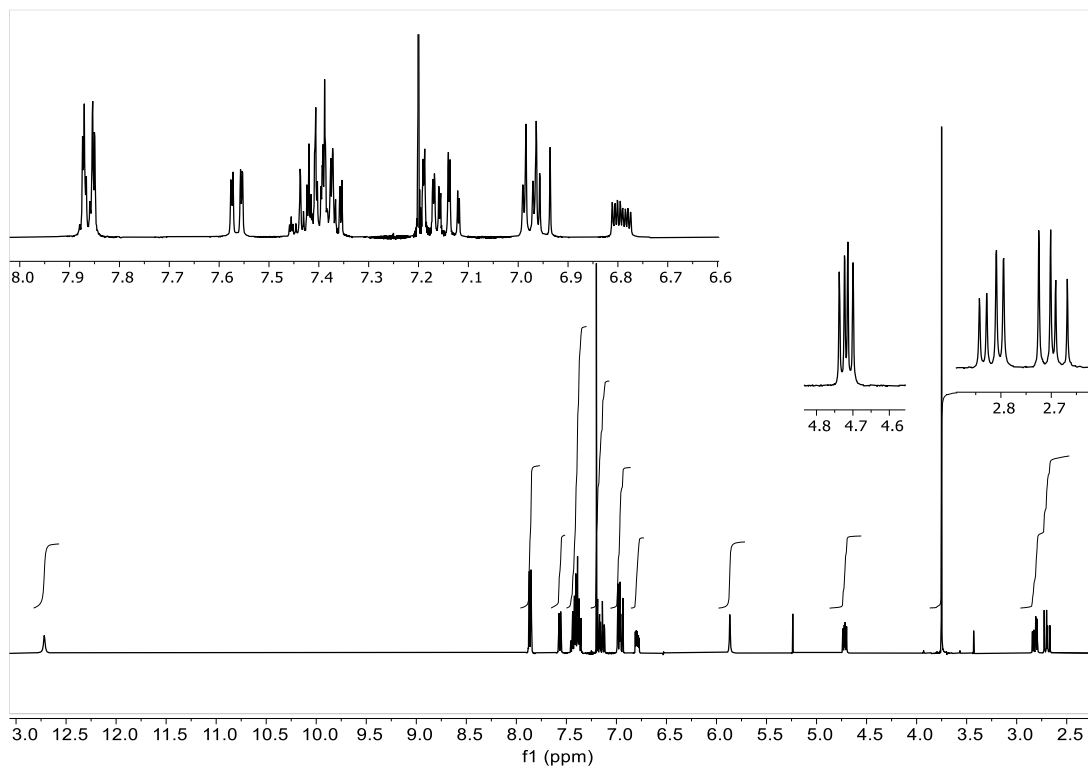
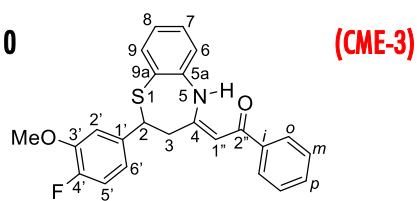


Figure S18:  $^{19}\text{F}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

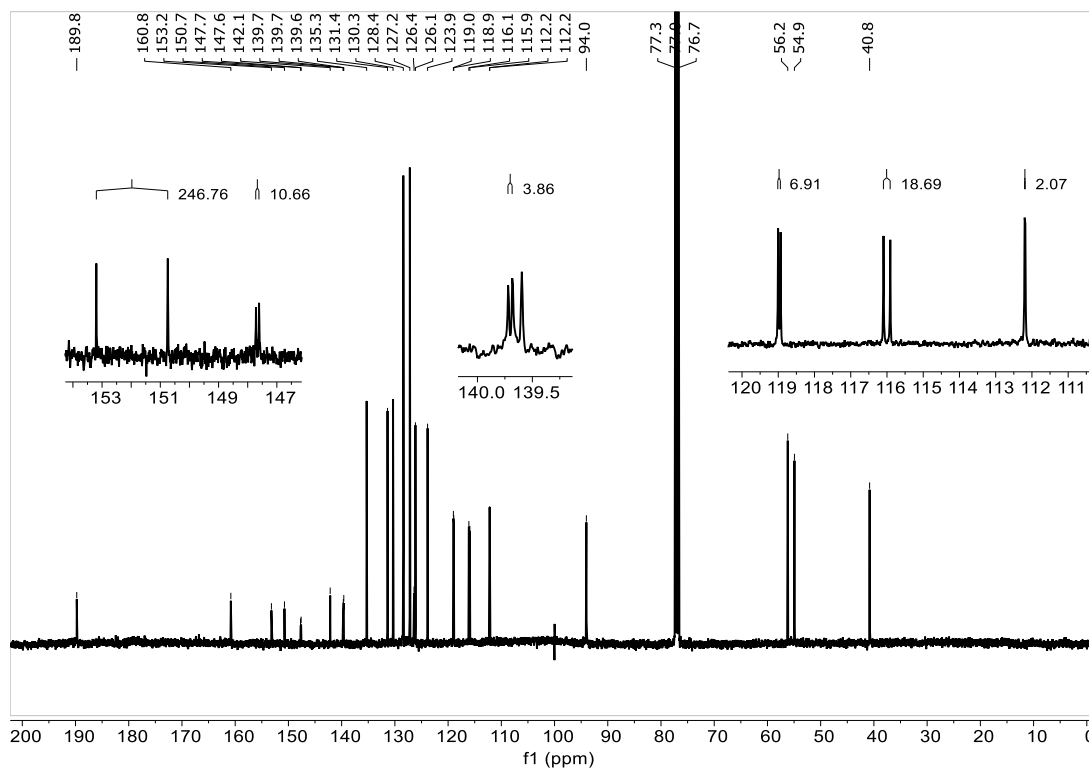




Compound **10**



**Figure S19:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$



**Figure S20:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

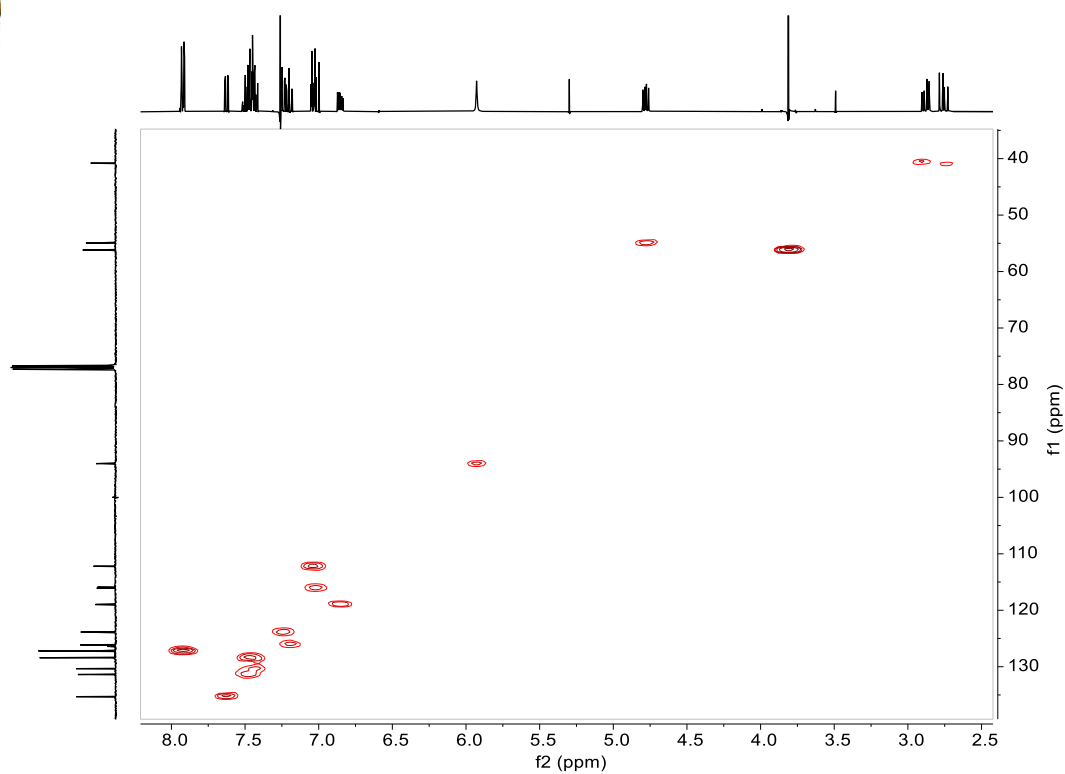


Figure S21:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

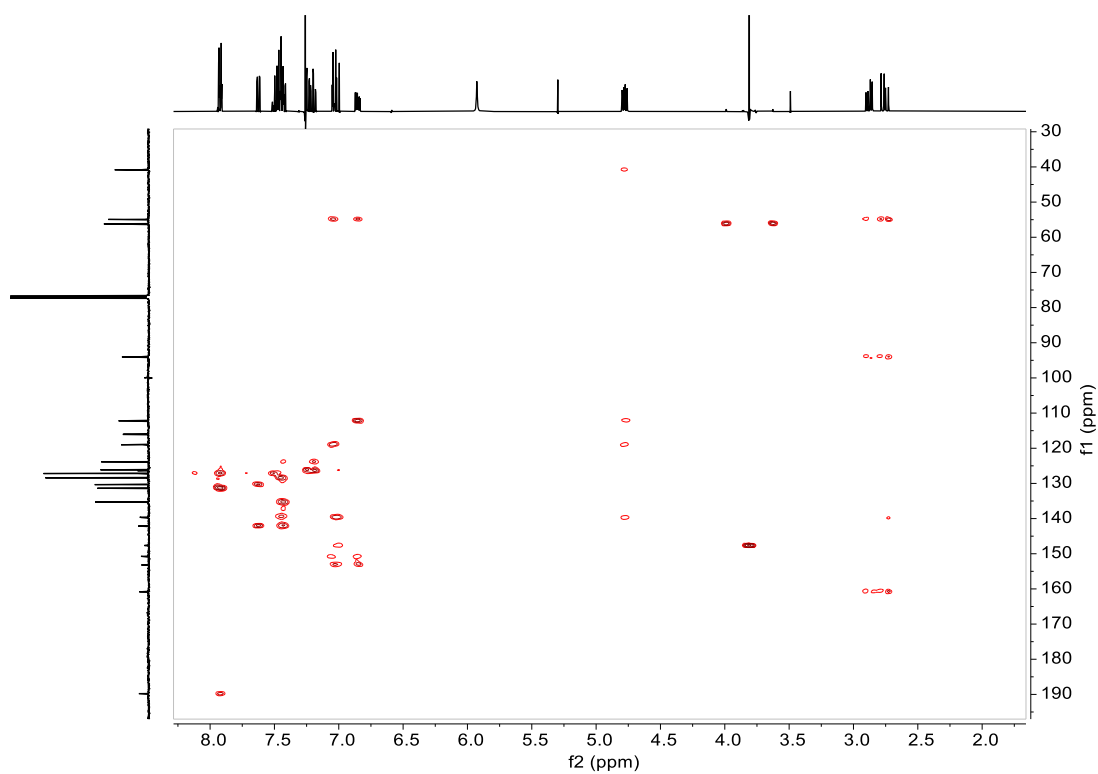


Figure S22:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HBQC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

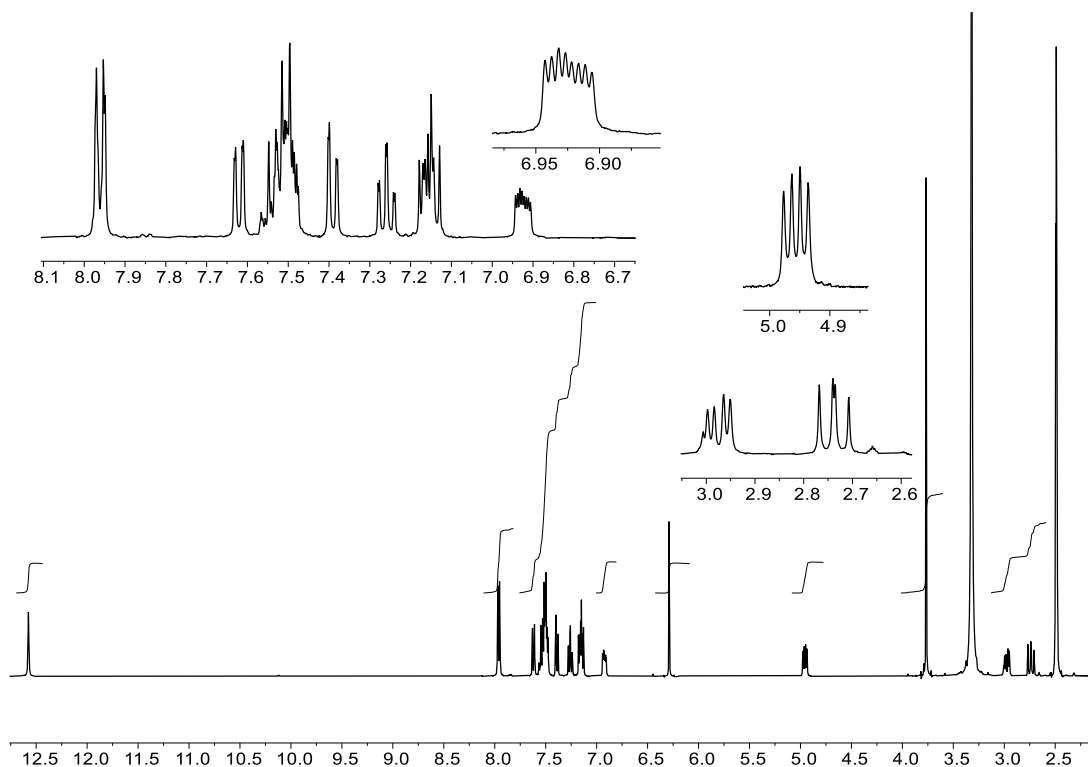


Figure S23:  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

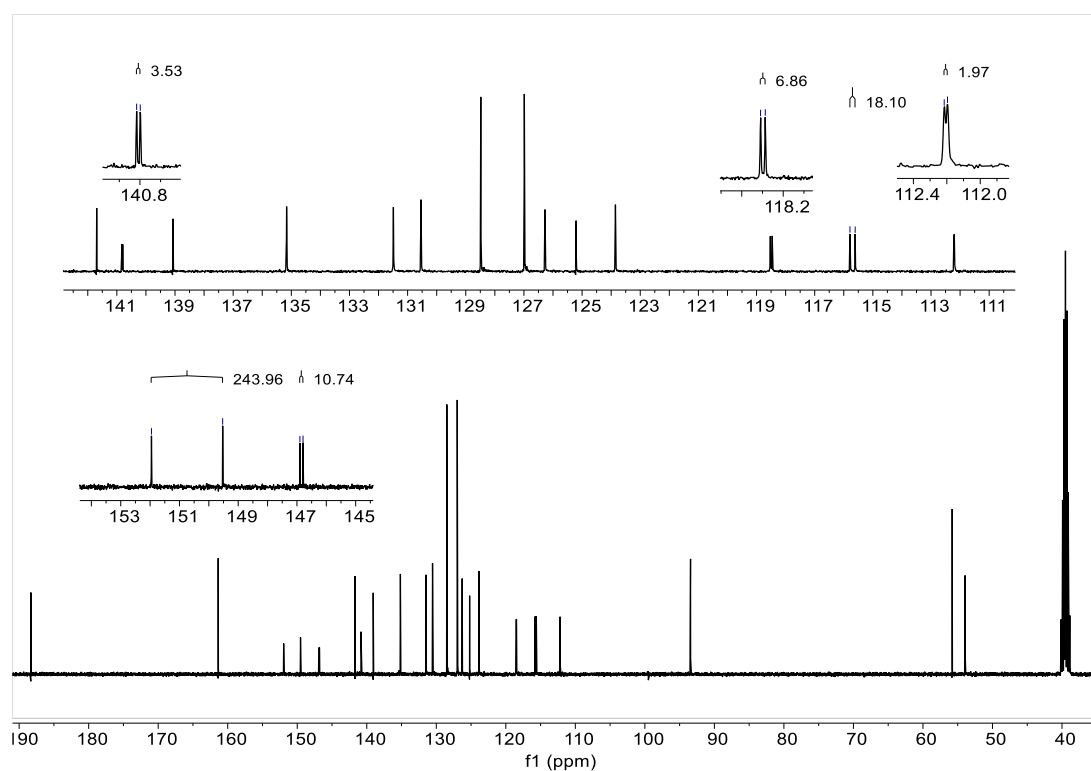


Figure S24:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

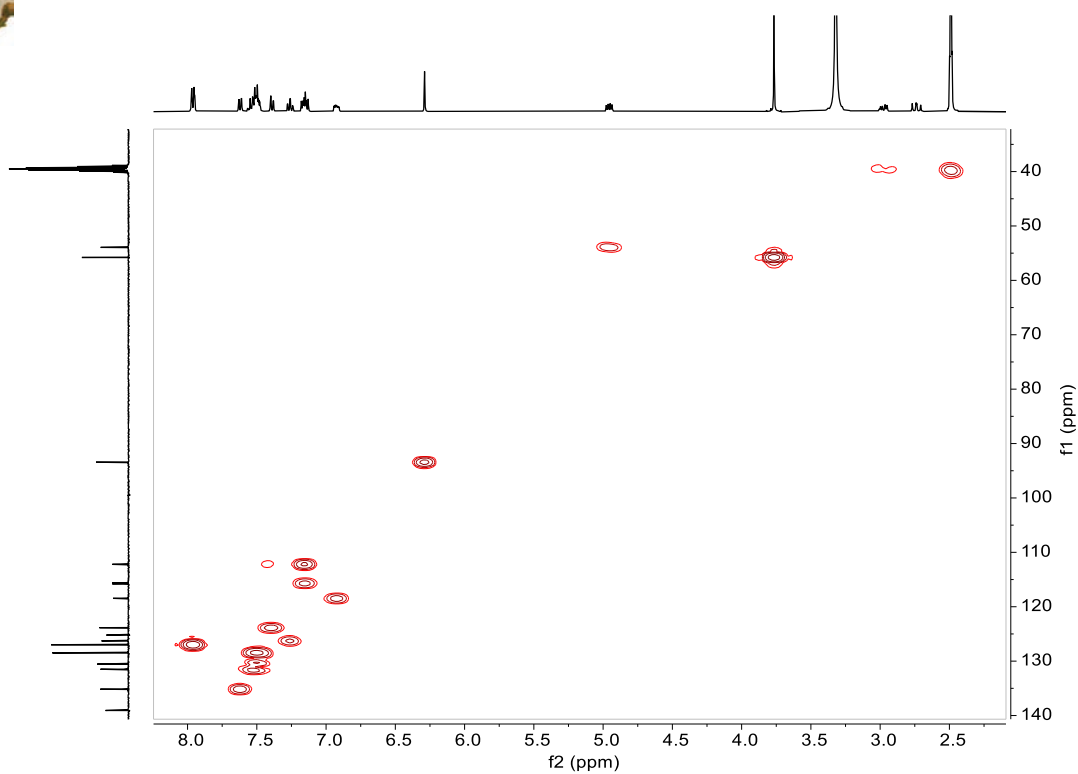


Figure S25:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

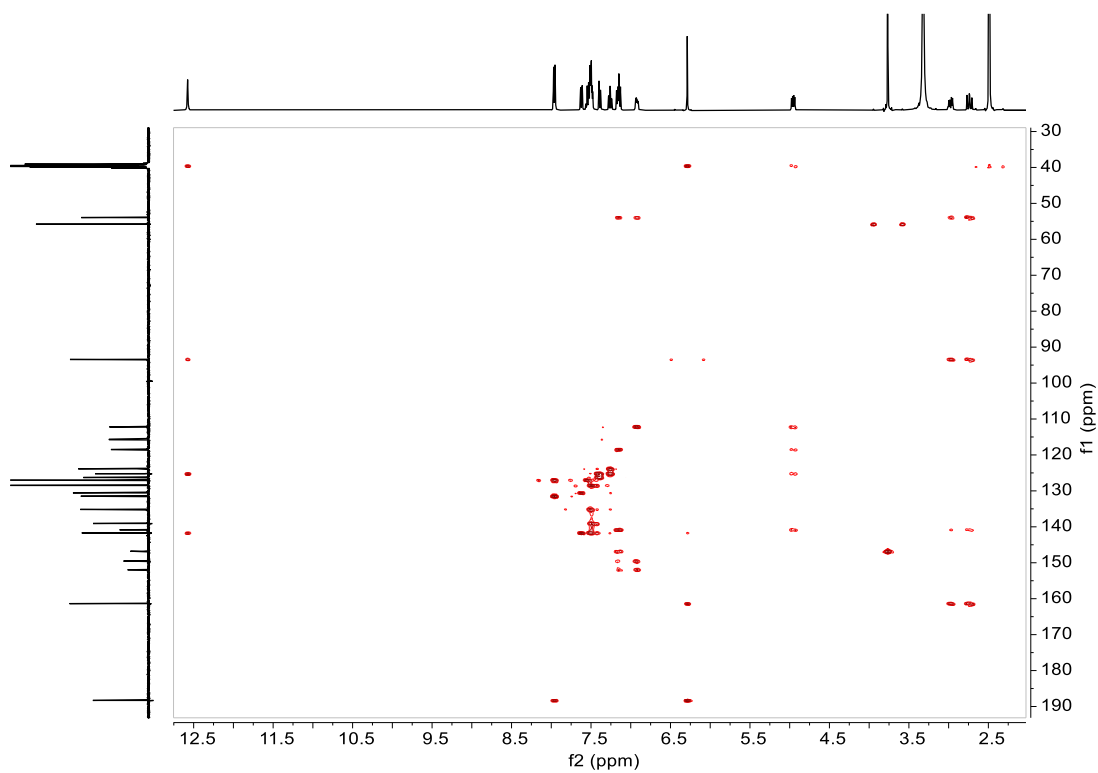


Figure S26:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

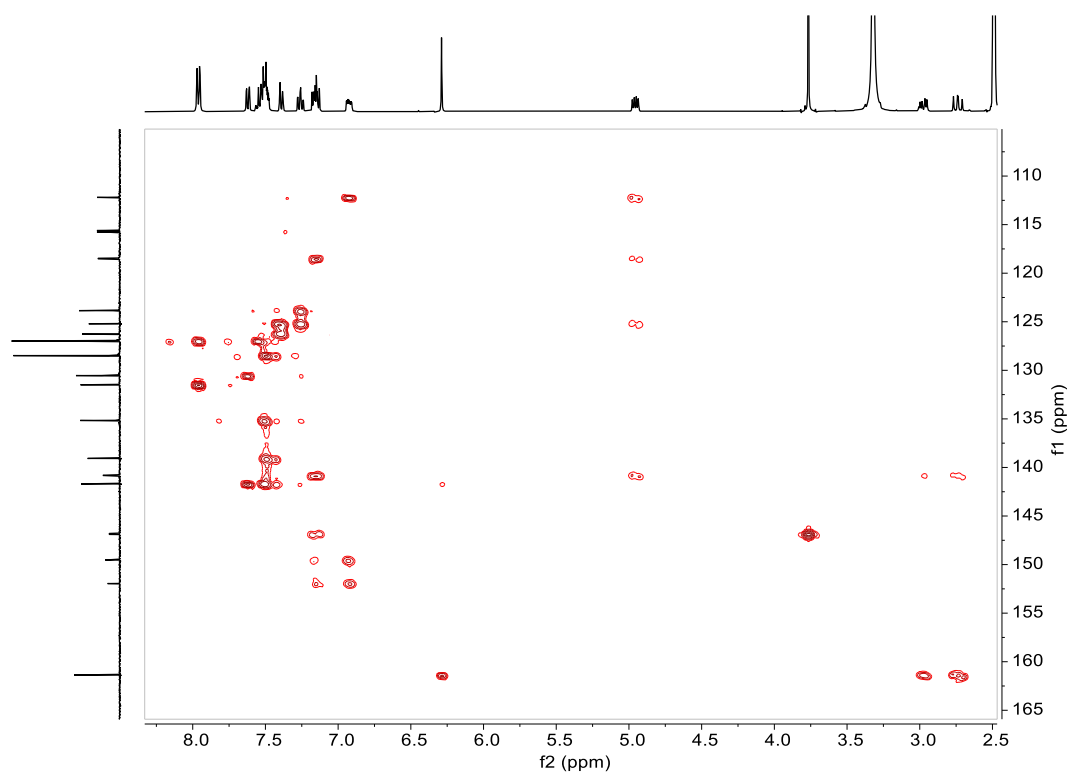


Figure S27:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

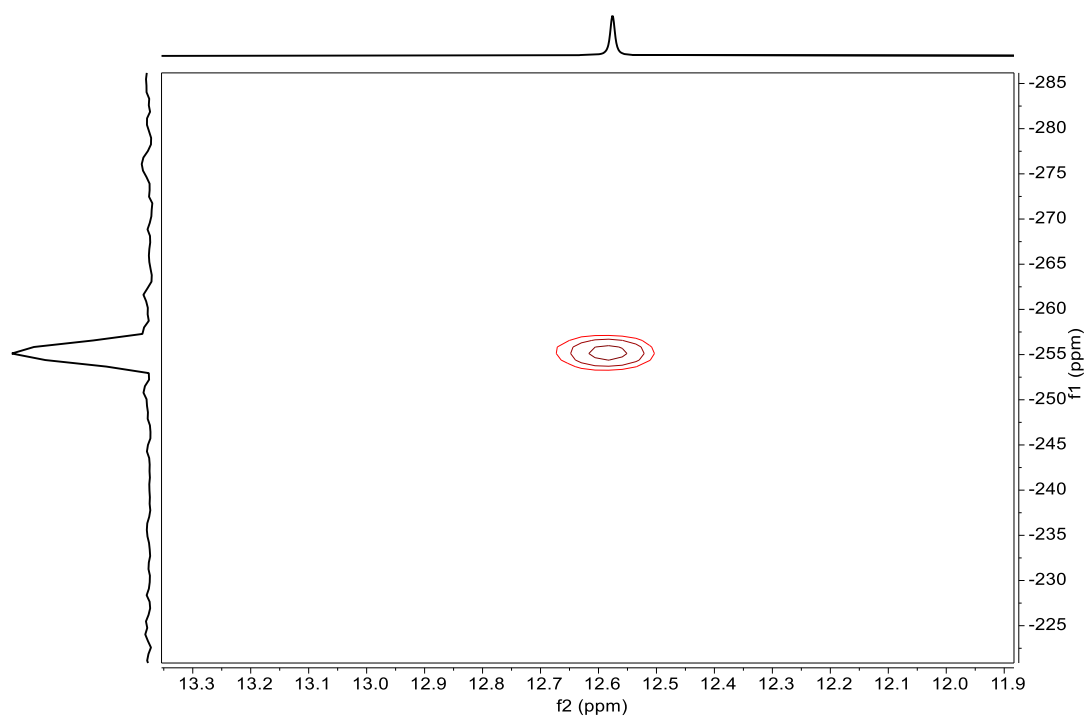


Figure S28:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$



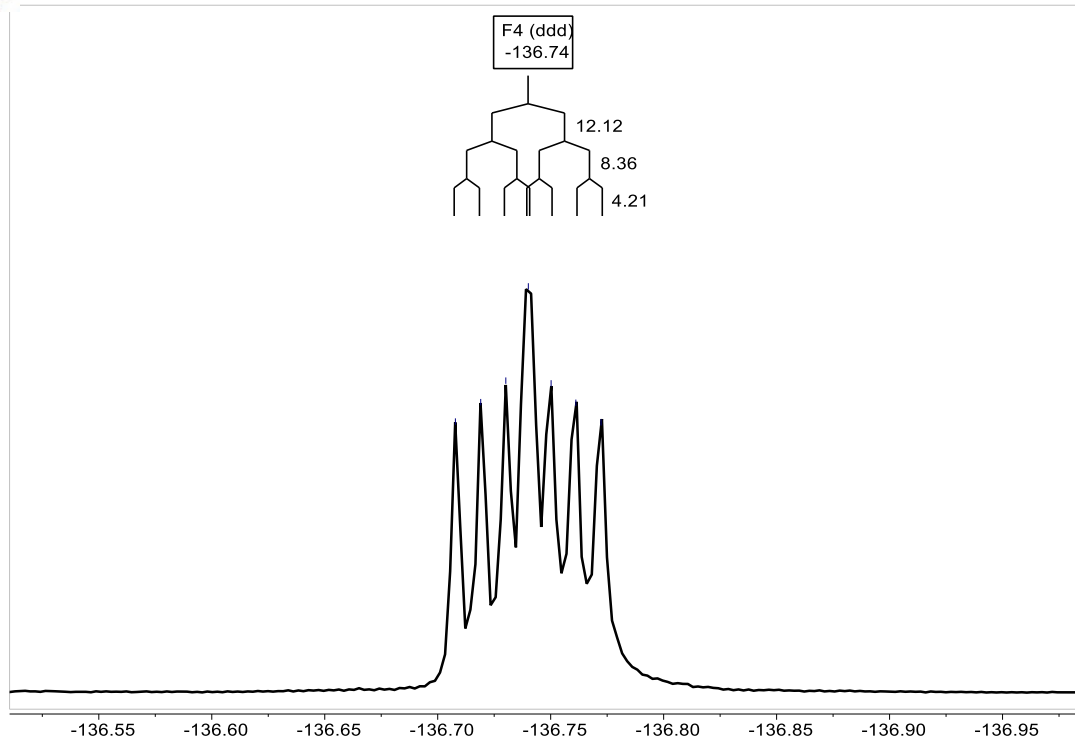


Figure S29:  $^{19}\text{F}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

Compound 11

CME-1

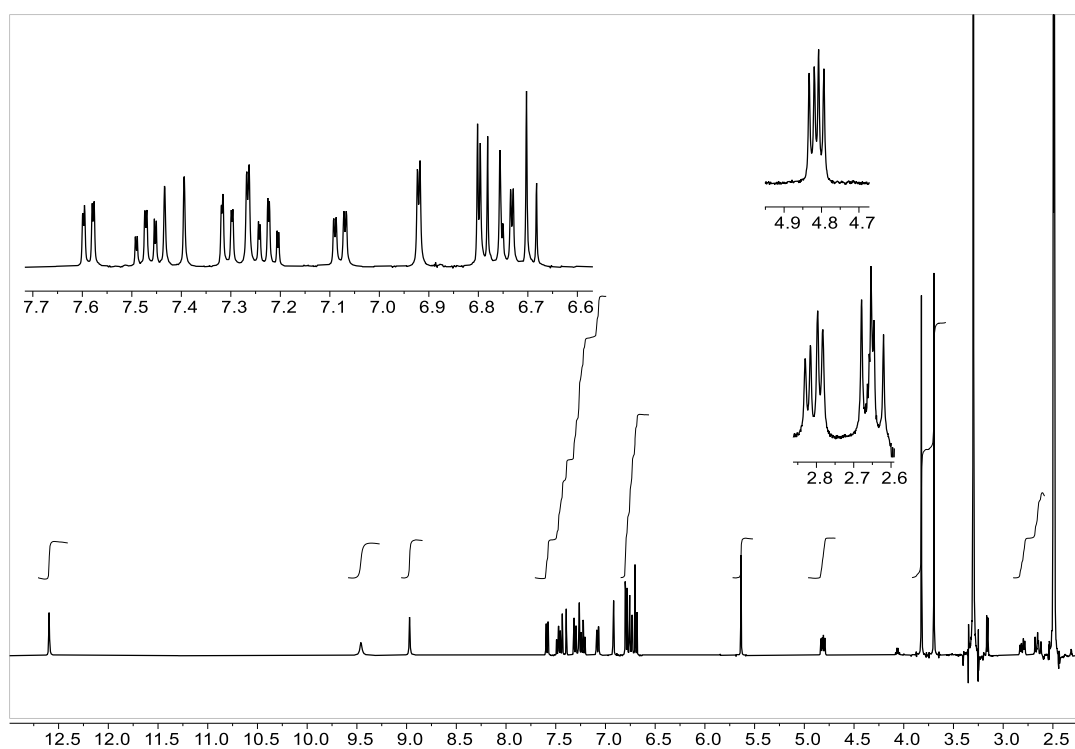
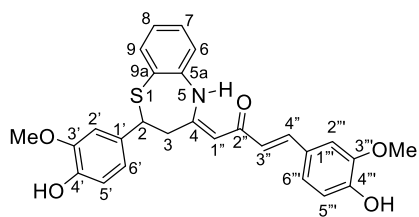


Figure S30:  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

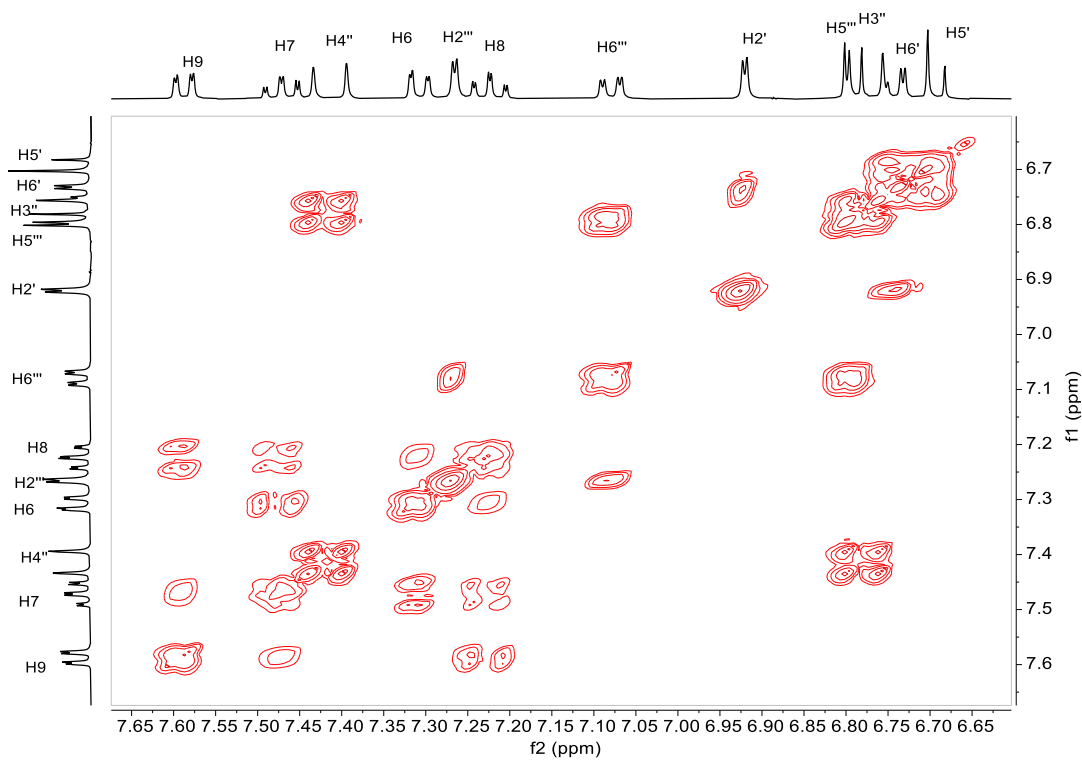


Figure S31:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

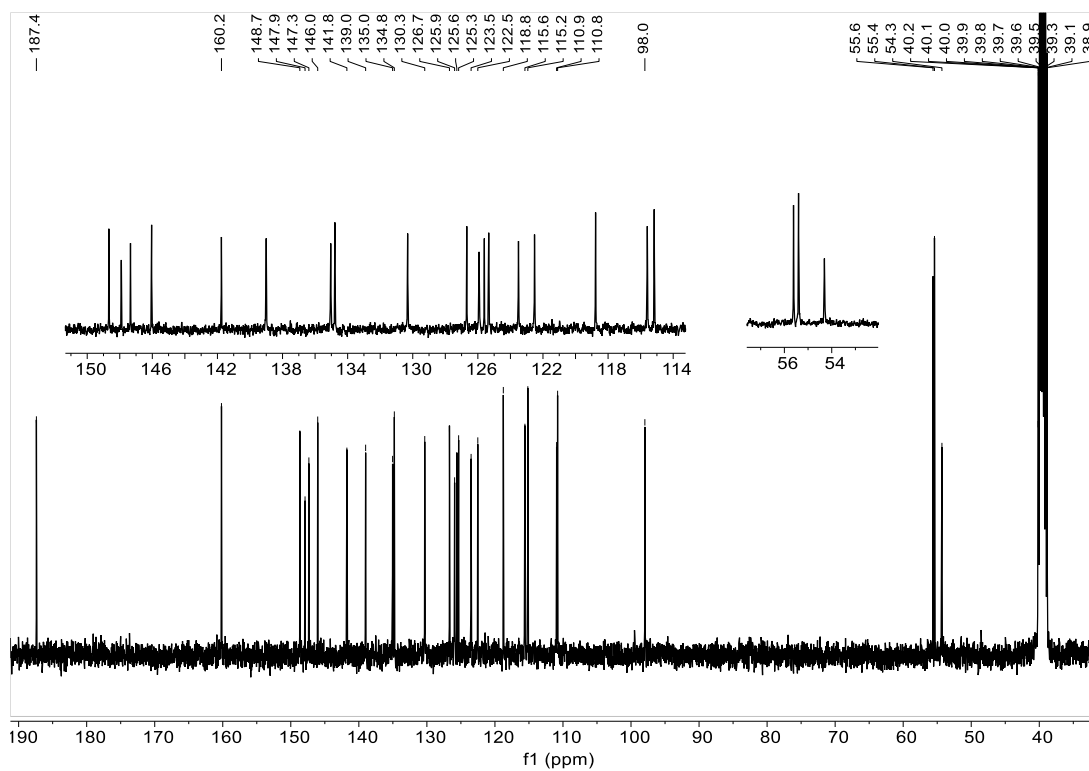
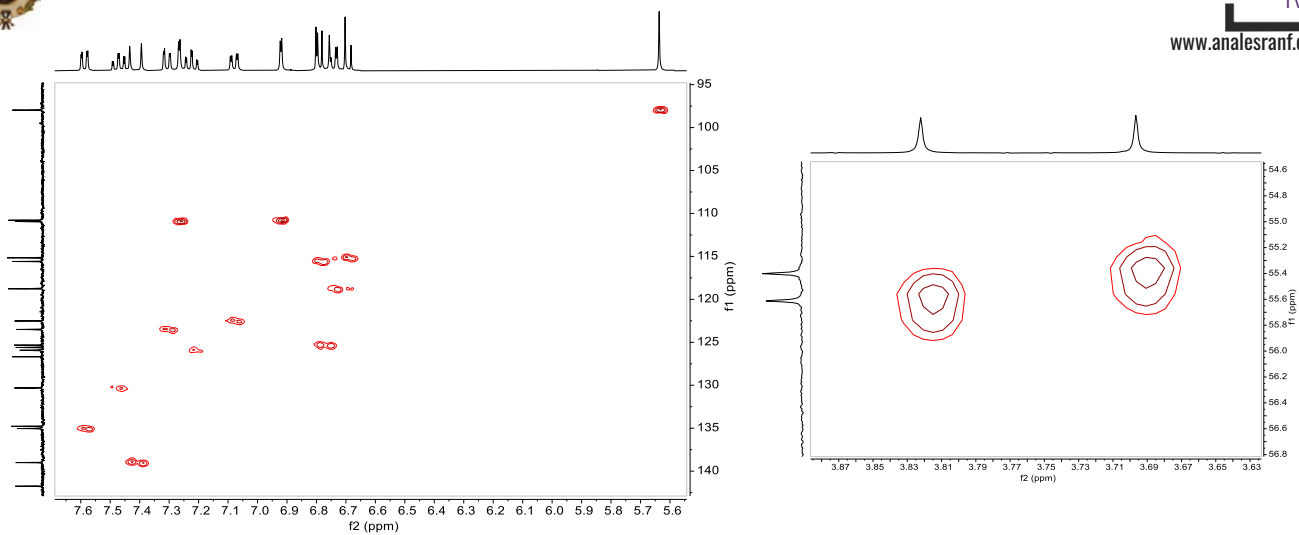


Figure S32:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$



**Figure S33:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

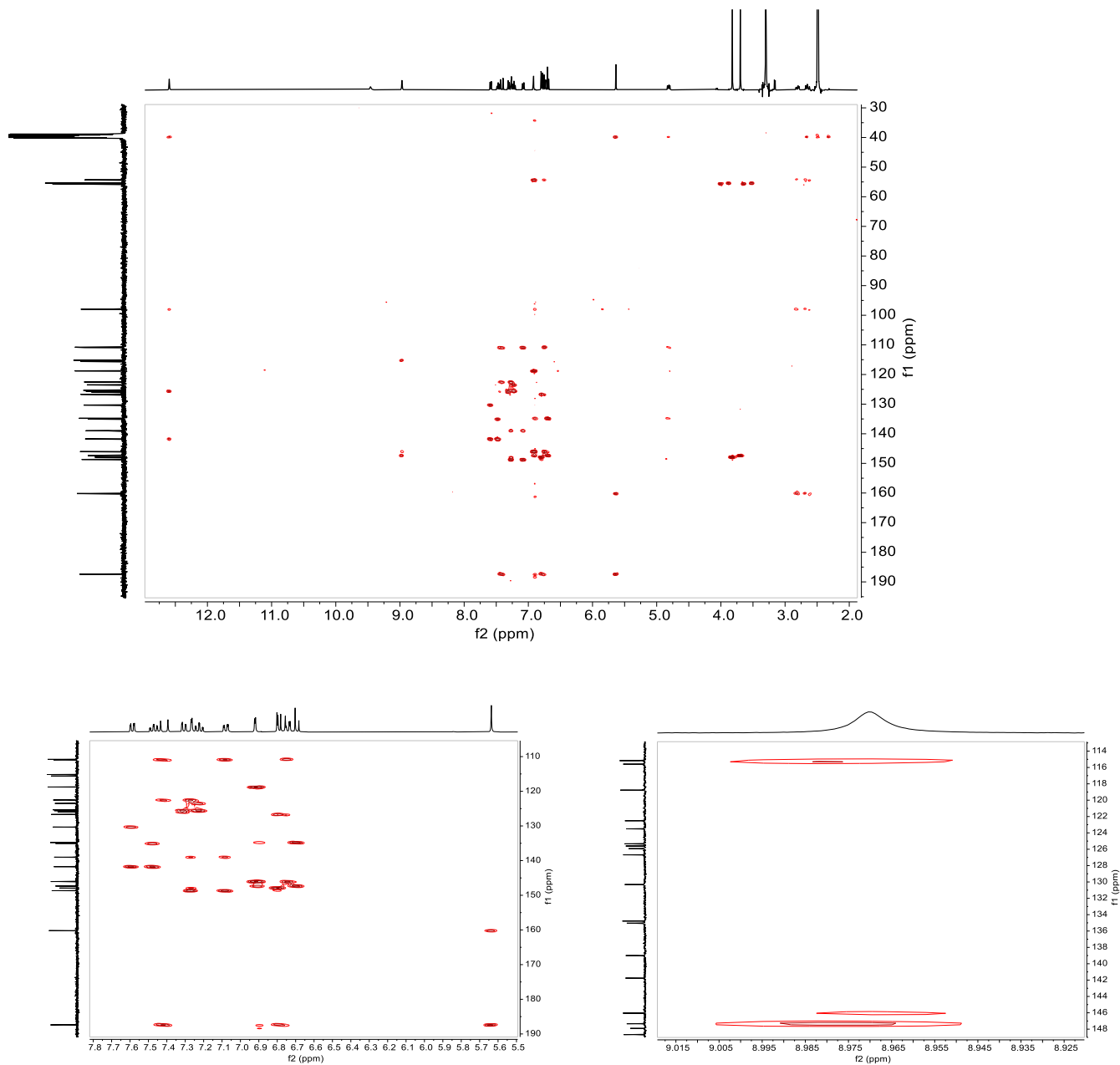




Figure S34:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

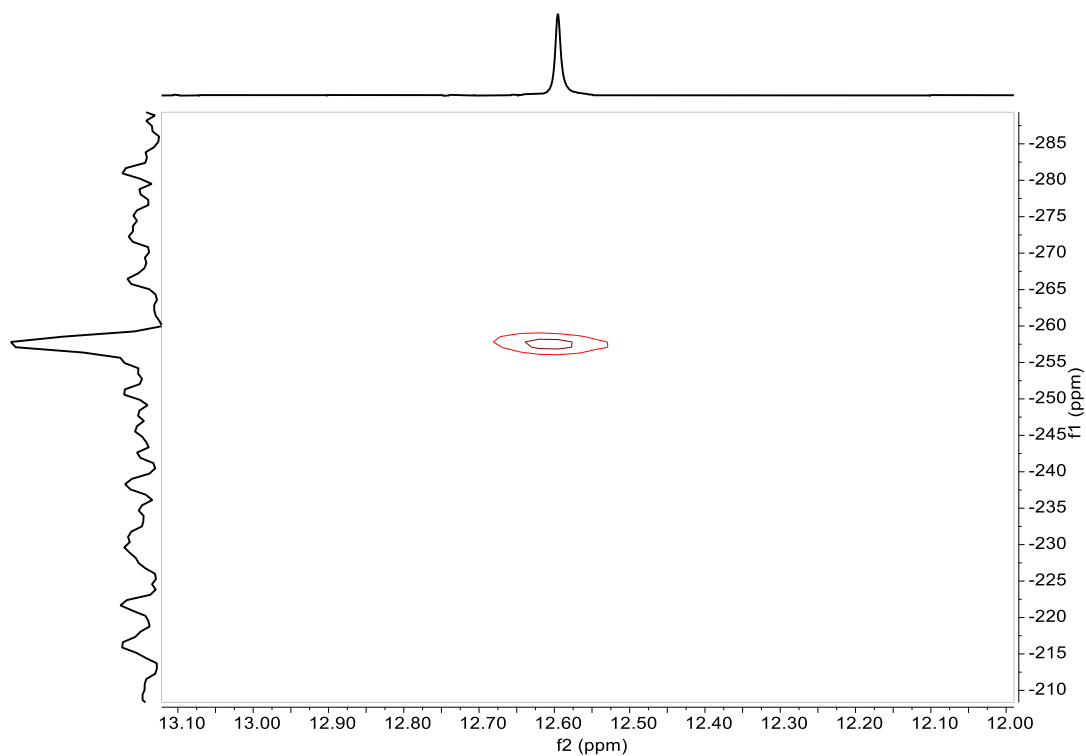


Figure S35:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{DMSO}-d_6$

### Compound 12

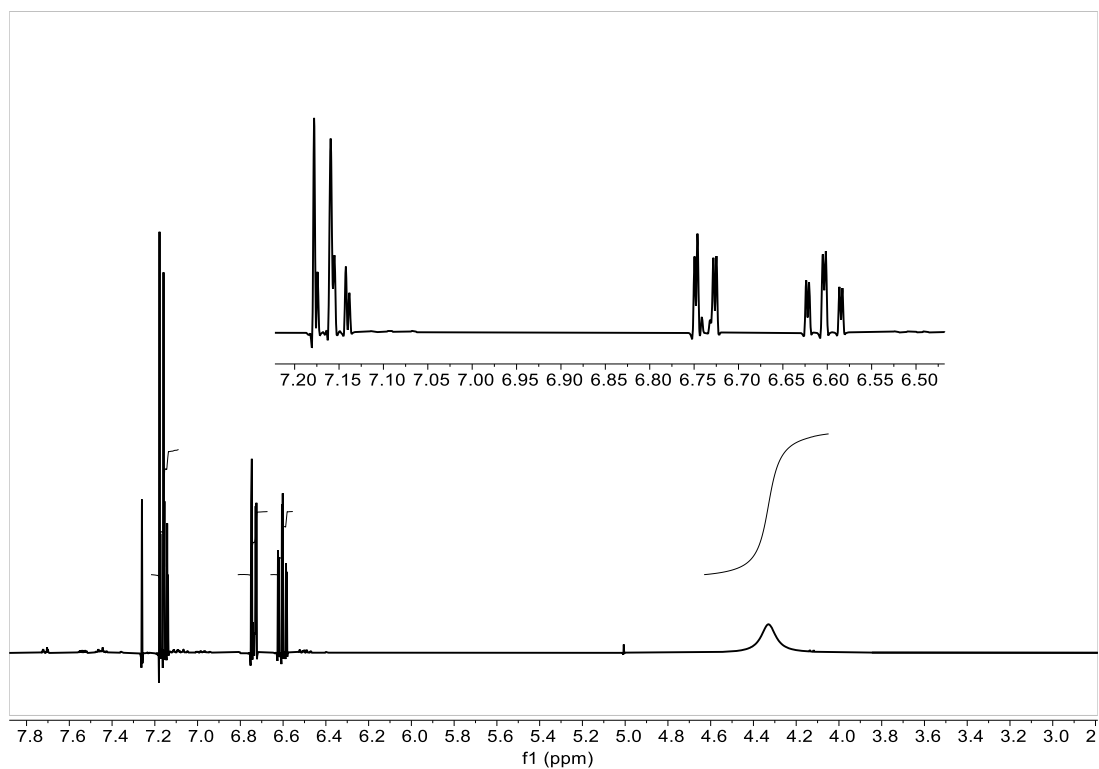
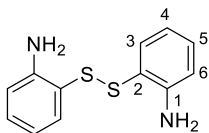




Figure S36:  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

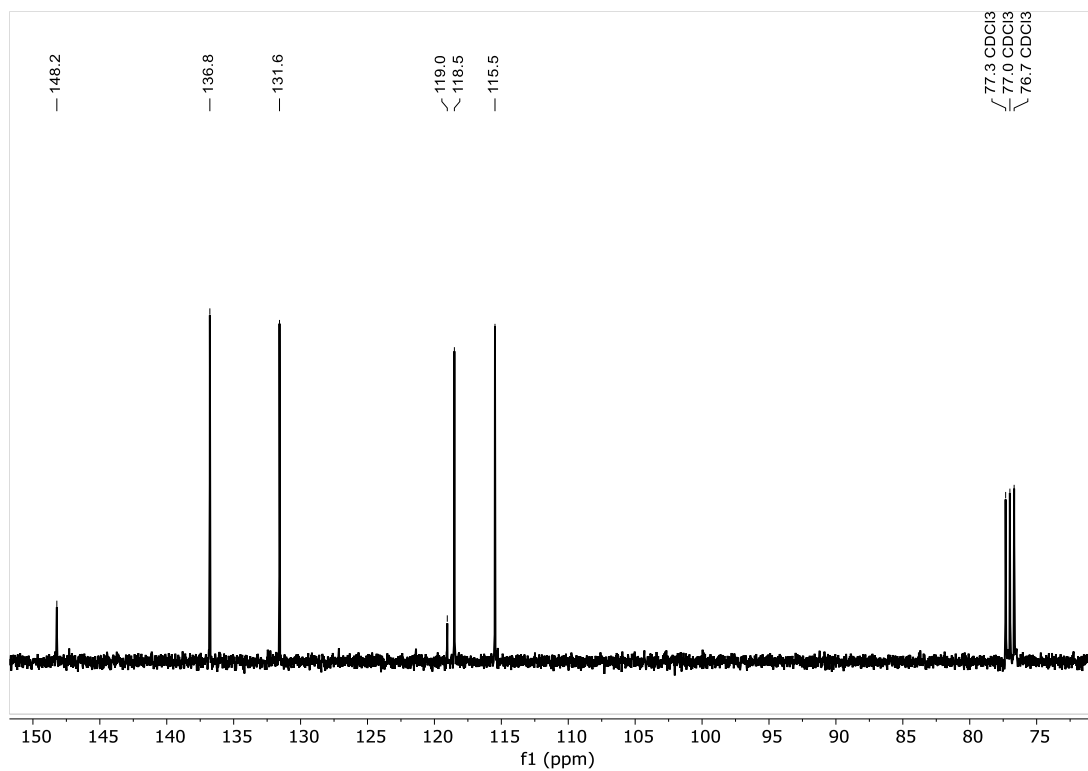


Figure S37:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

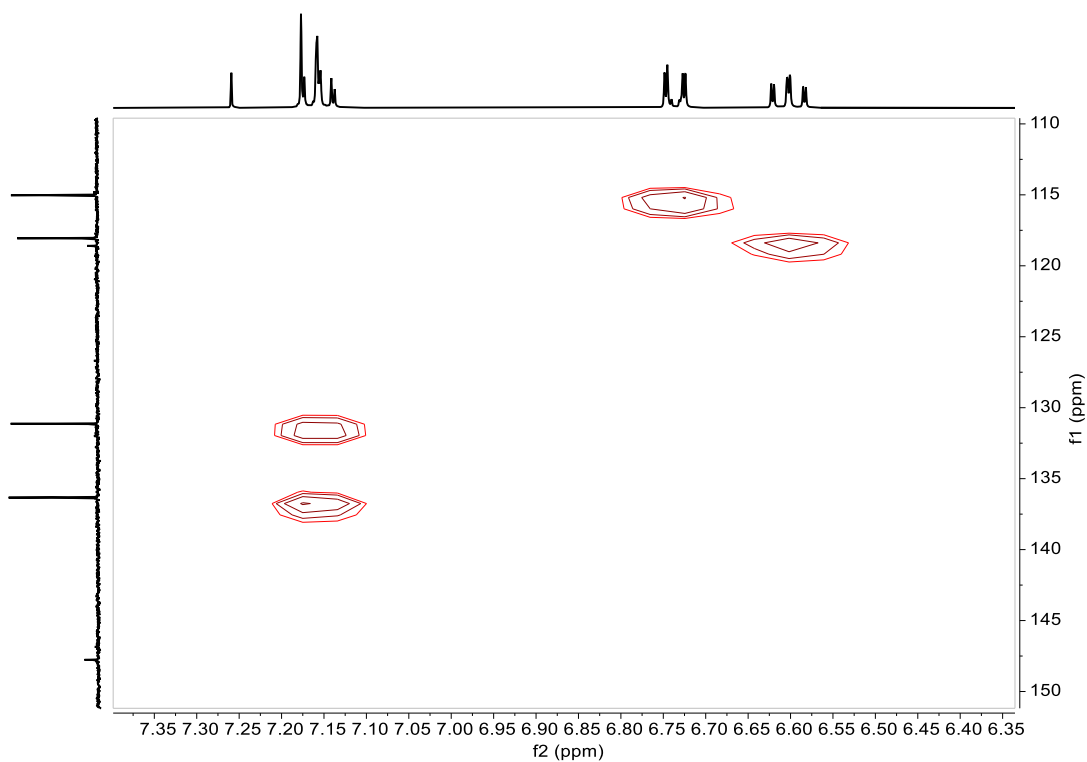


Figure S38:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

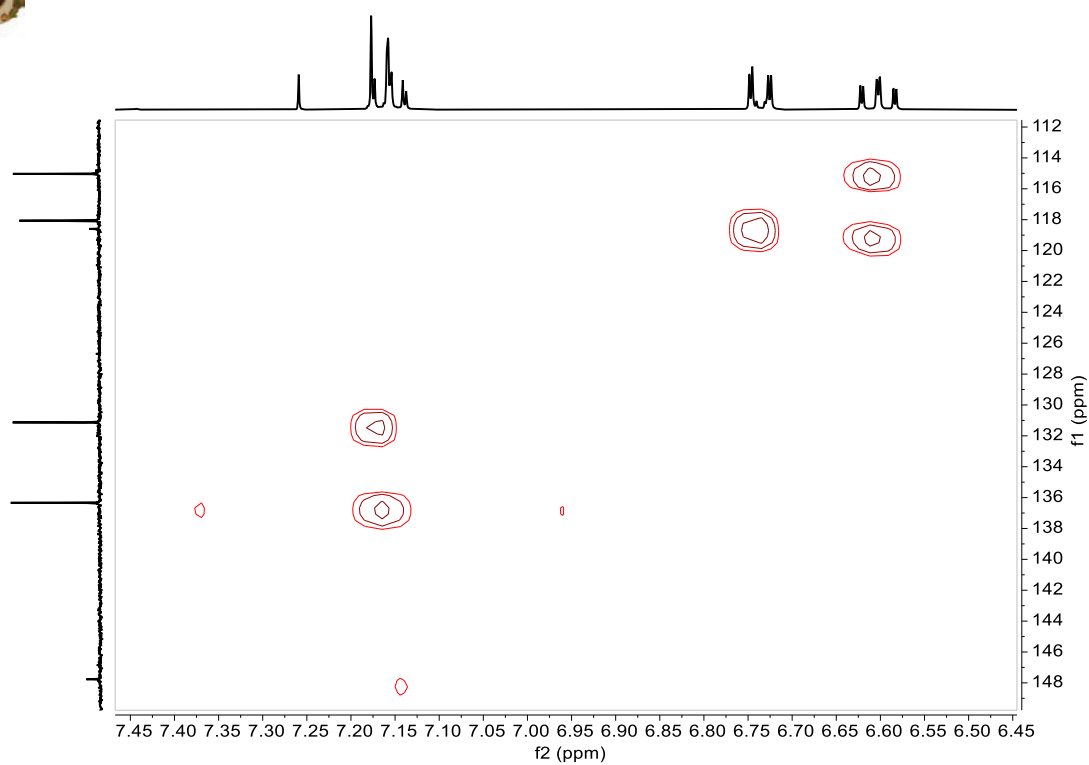


Figure S39:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

Compound

13

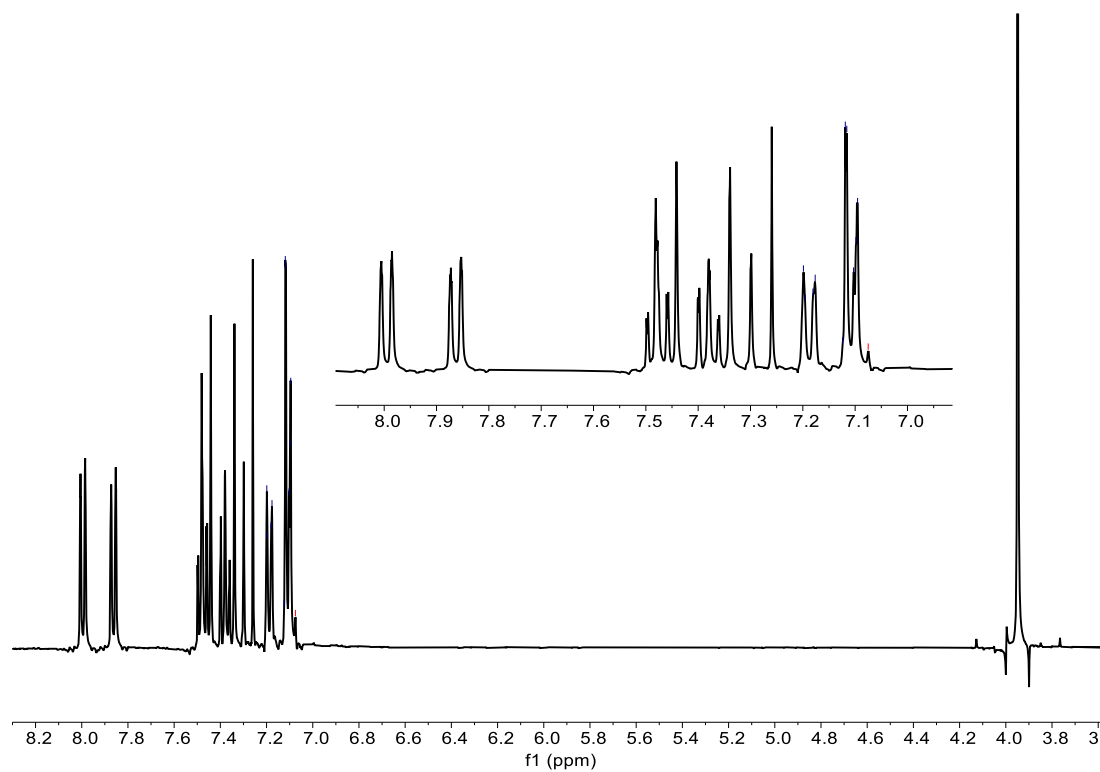
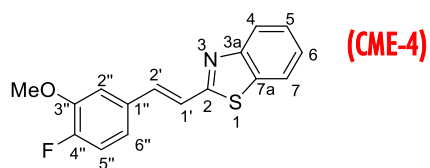


Figure S40:  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$



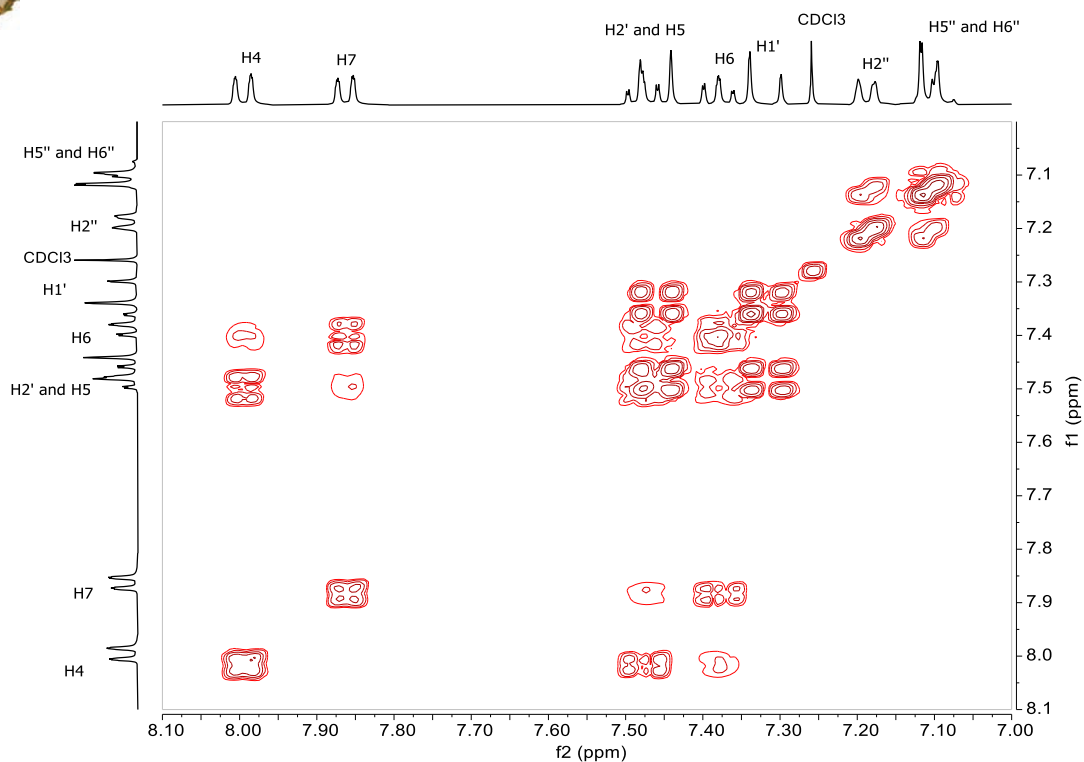


Figure S41:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

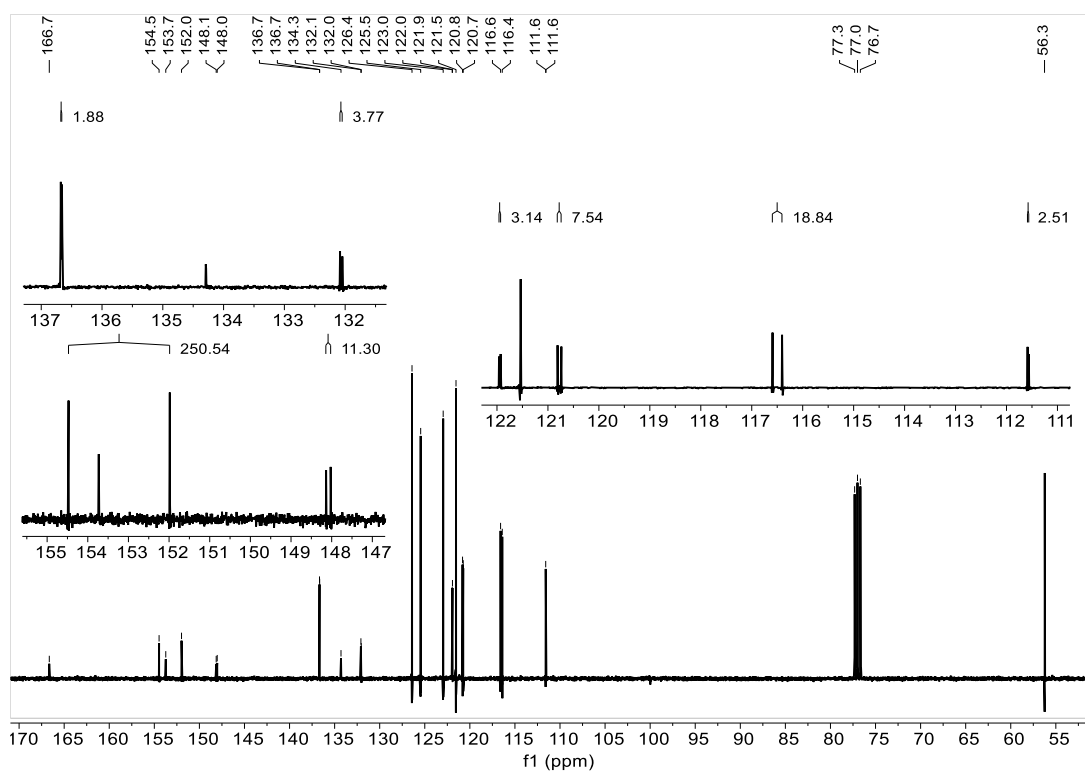


Figure S42:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

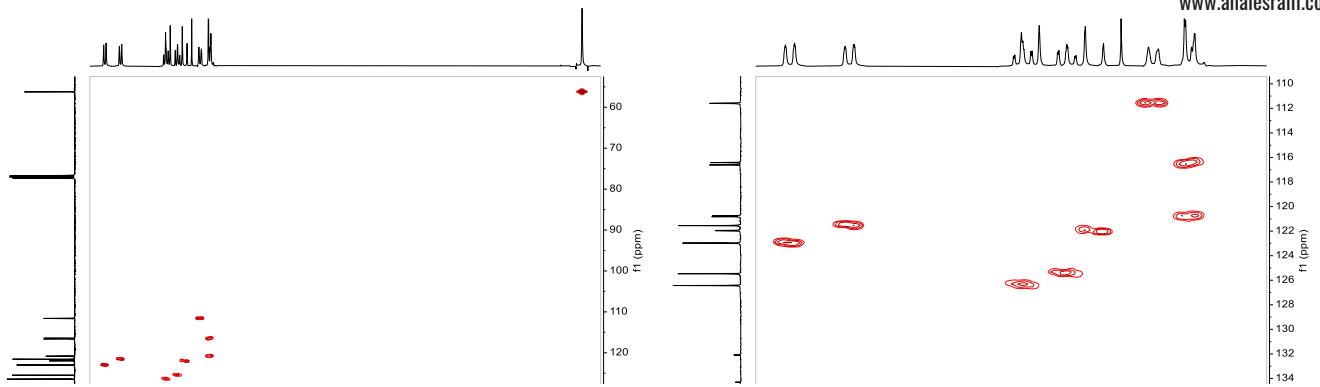


Figure S43:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

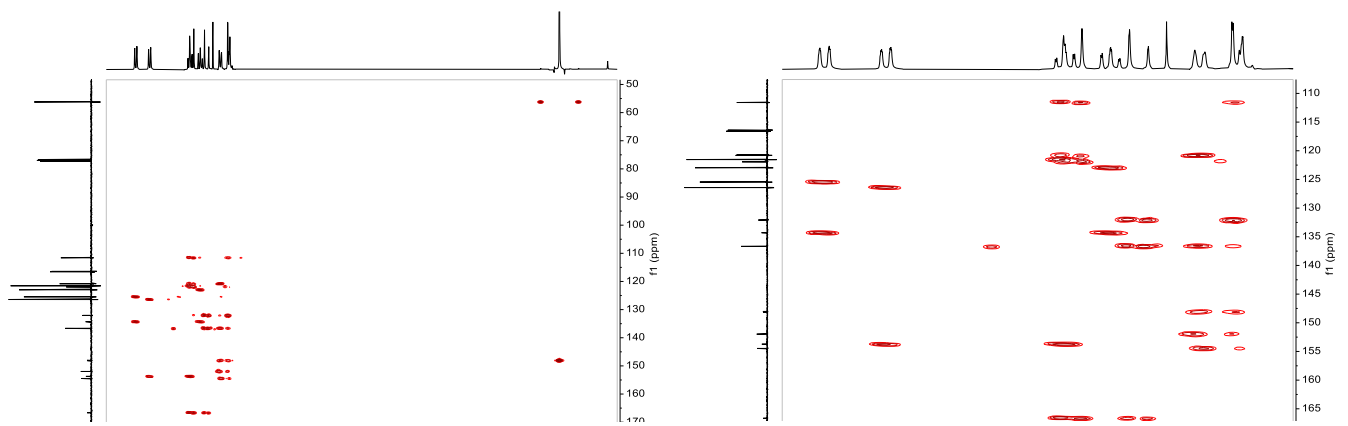
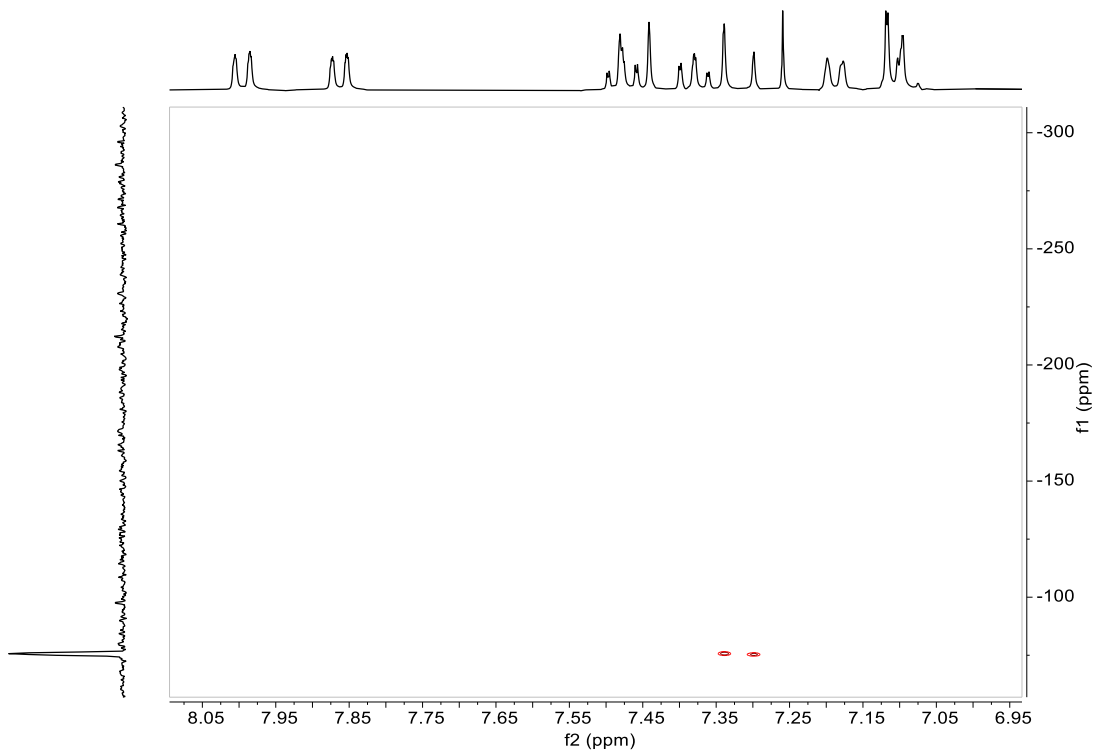
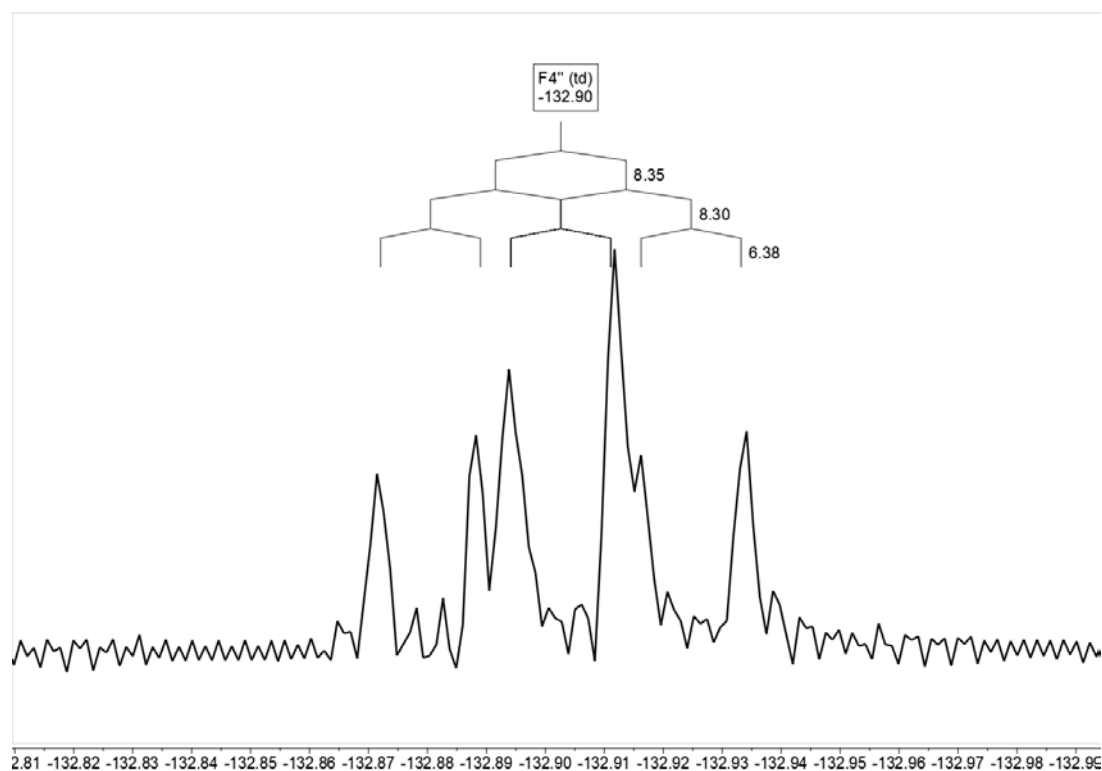


Figure S44:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$





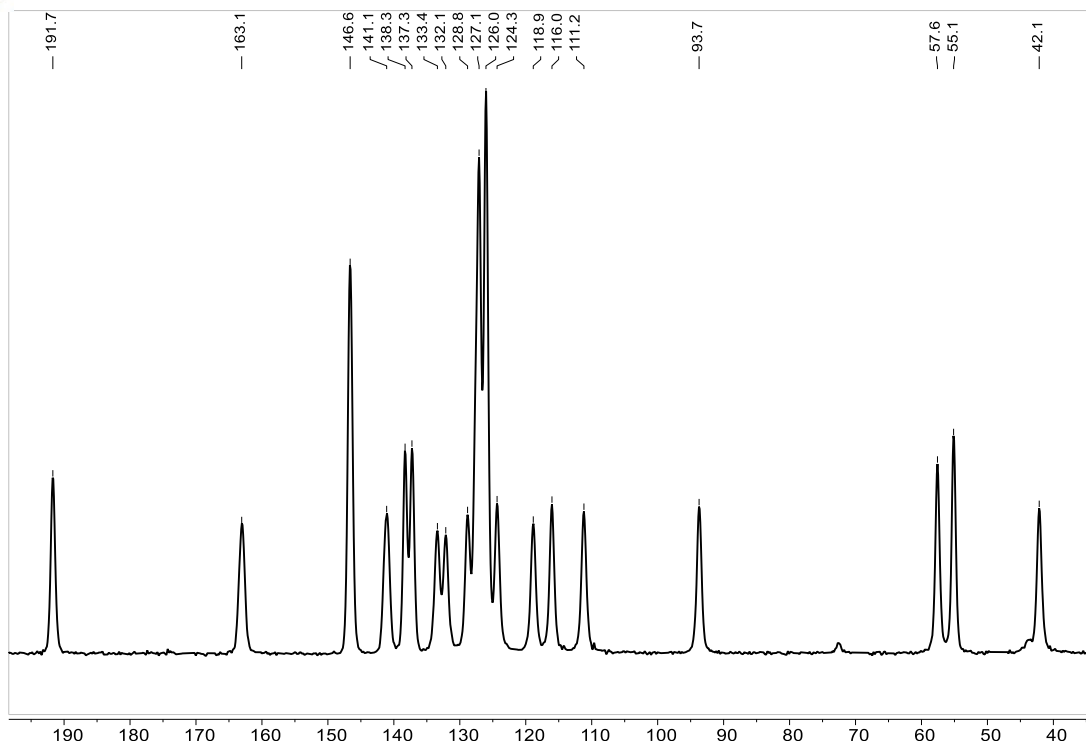
**Figure S45:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$



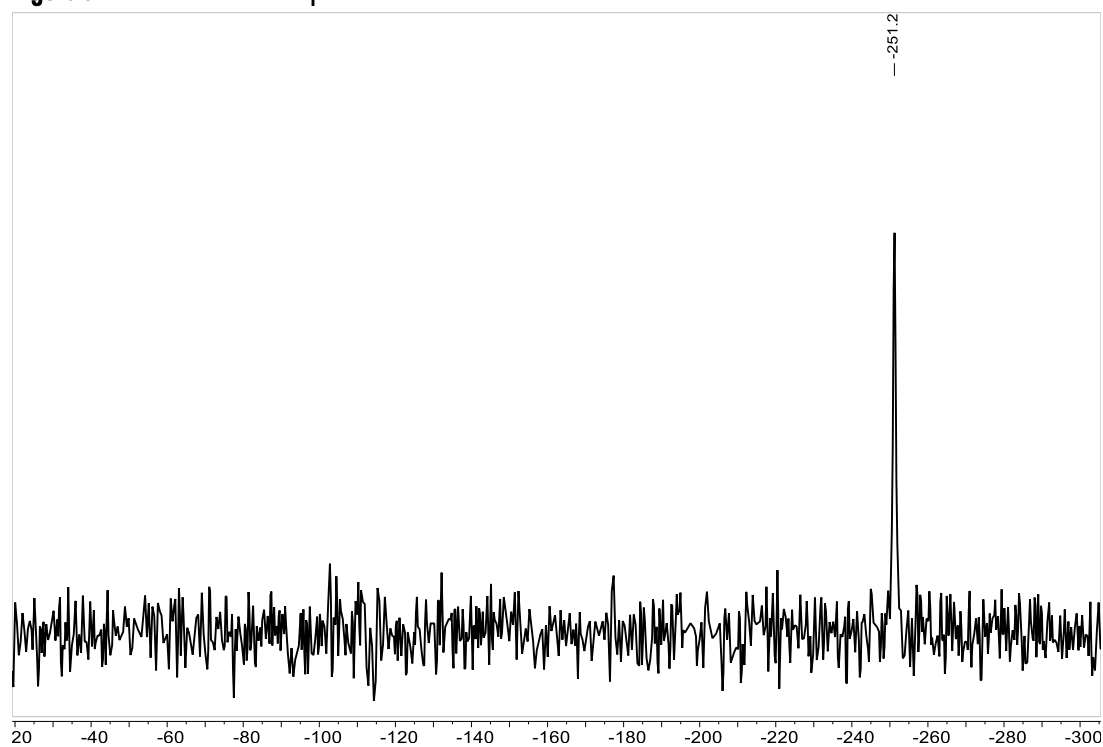
**Figure S46:**  $^{19}\text{F}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$

## 2. NMR spectra in Solid state

Compound 8



**Figure S47:**  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR spectrum



**Figure S48:**  $^{15}\text{N}$ -CPMAS NMR spectrum

**Compound 9**

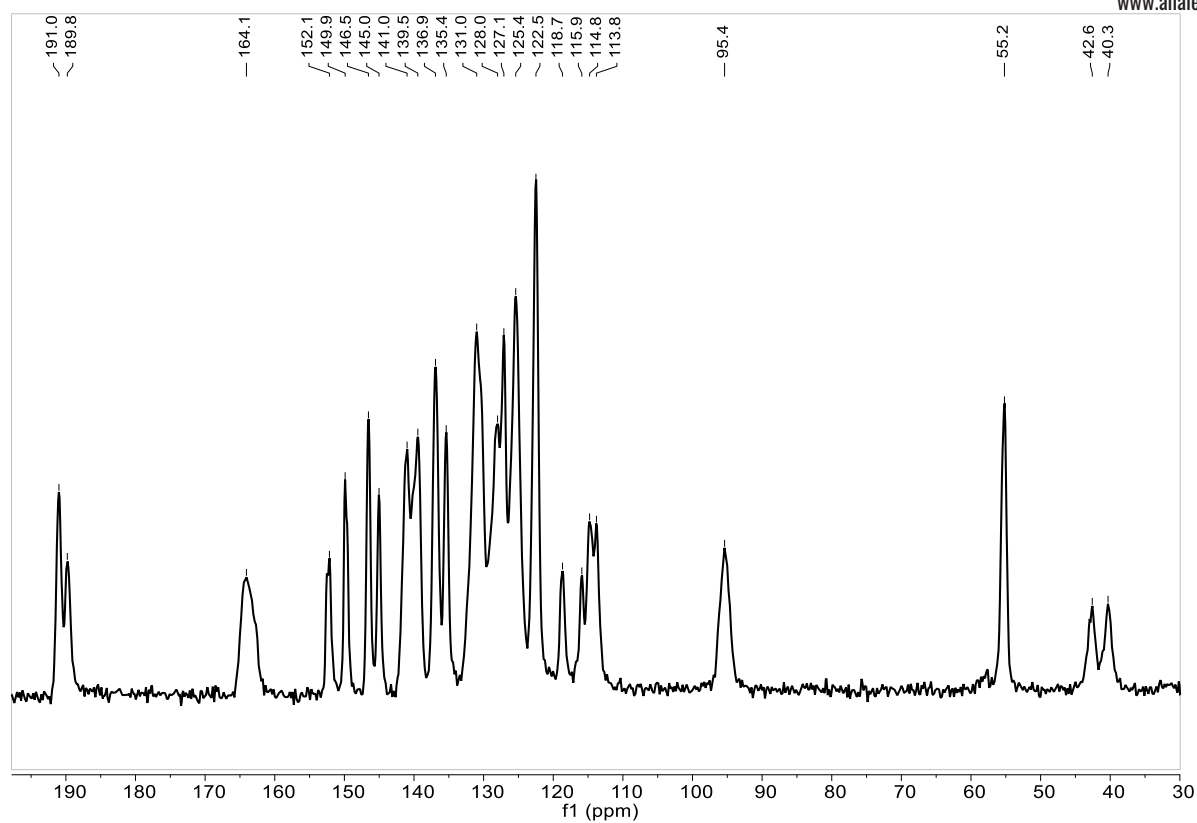


Figure S49:  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR spectrum

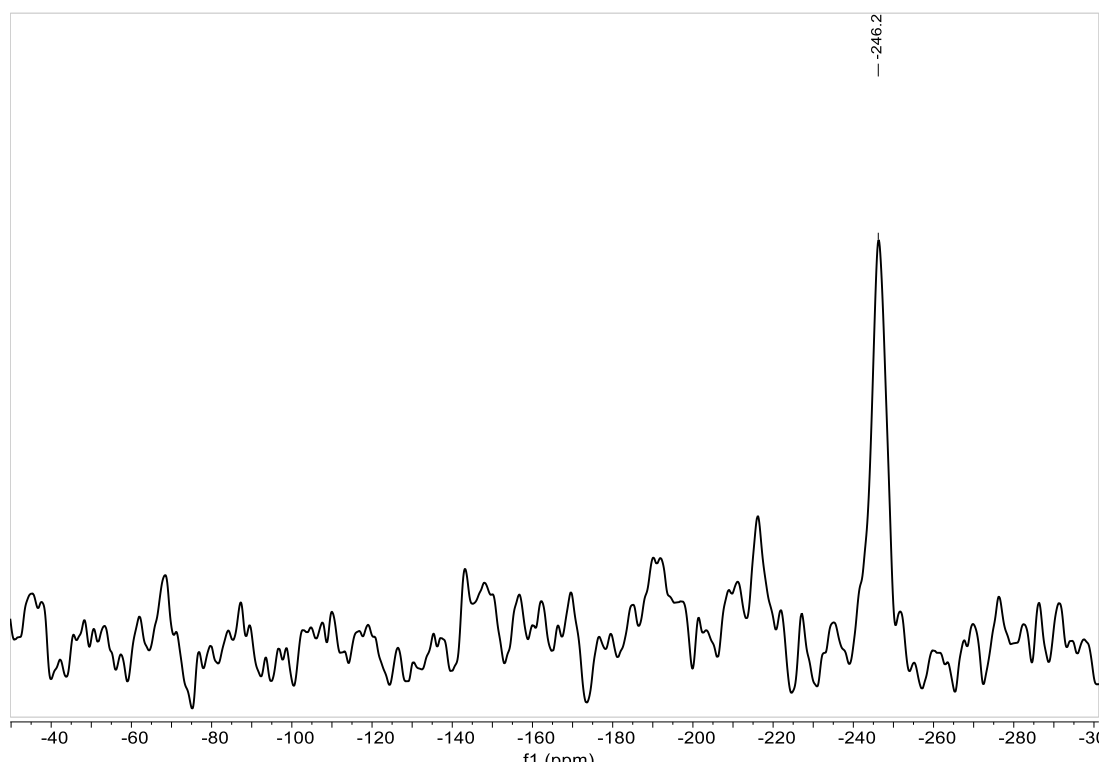
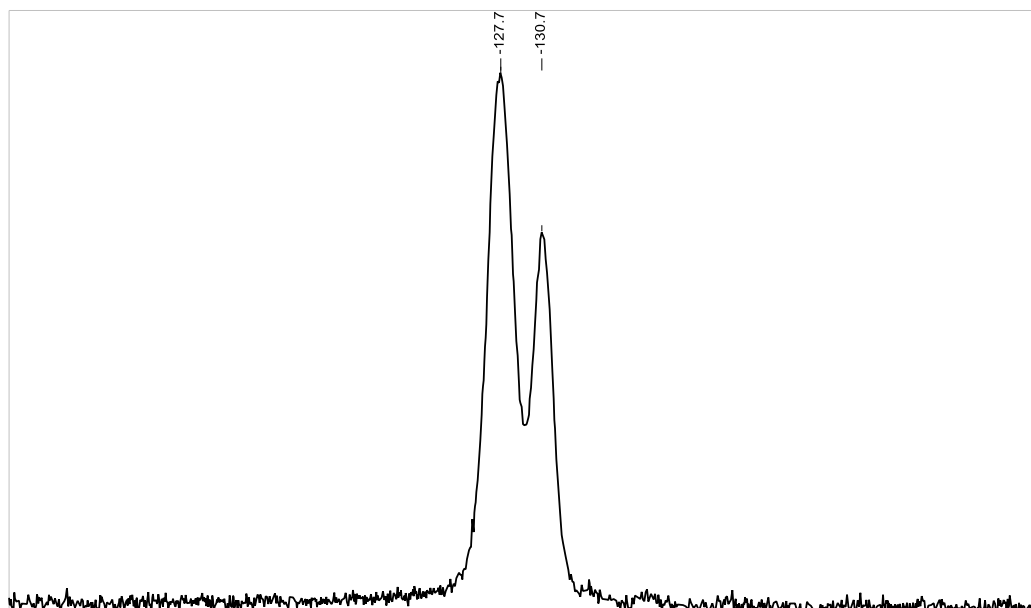


Figure S50:  $^{15}\text{N}$ -CPMAS NMR spectrum

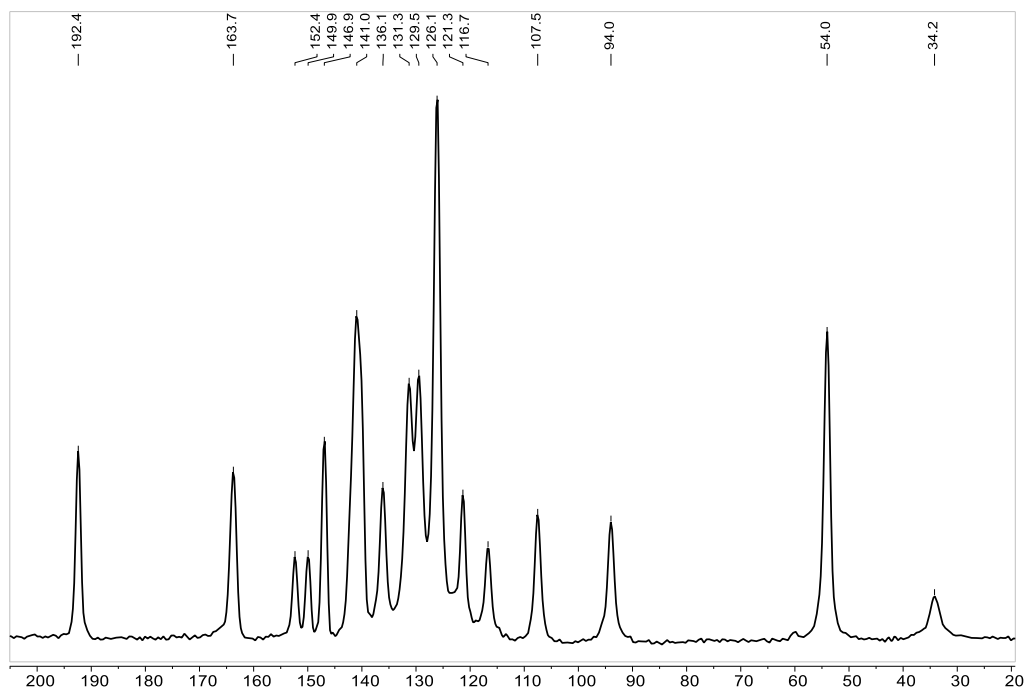


19

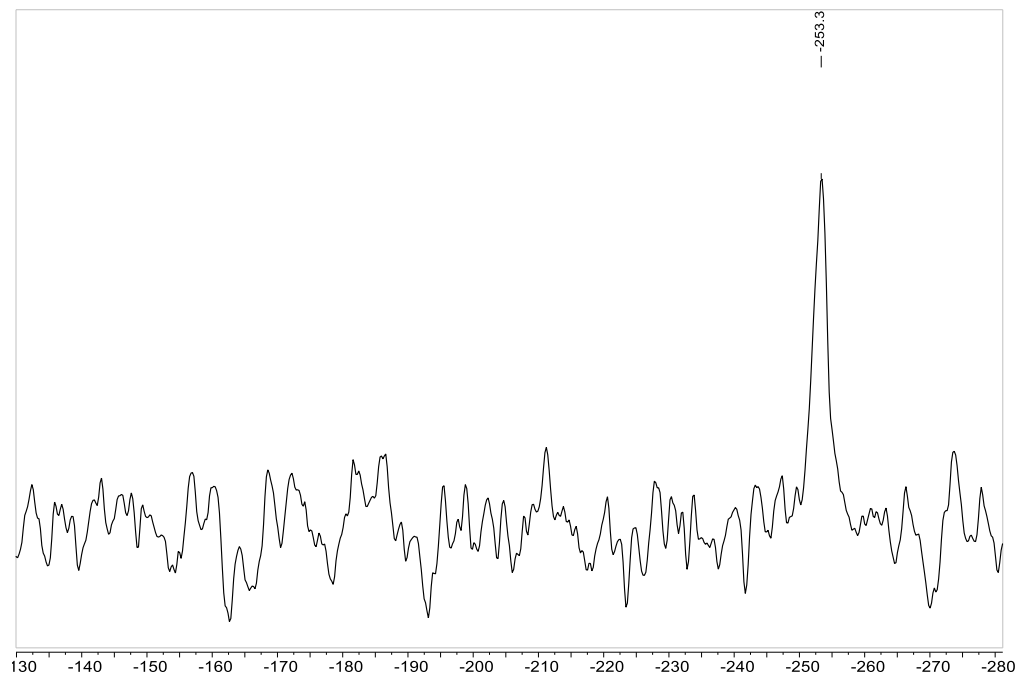
**Figure S51:** F-MAS NMR spectrum

**Compound 10**





**Figure S52:**  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR spectrum



**Figure S53:**  $^{15}\text{N}$ -CPMAS NMR spectrum

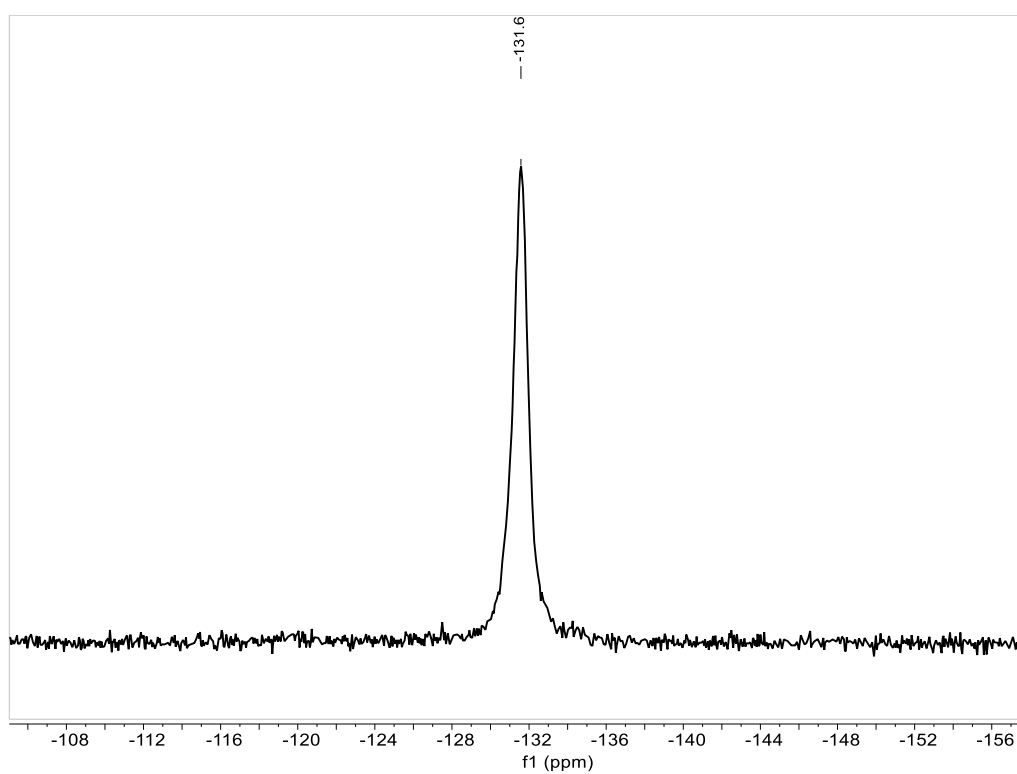


Figure S54:  $^{19}\text{F}$ -MAS NMR spectrum

### Compound 11

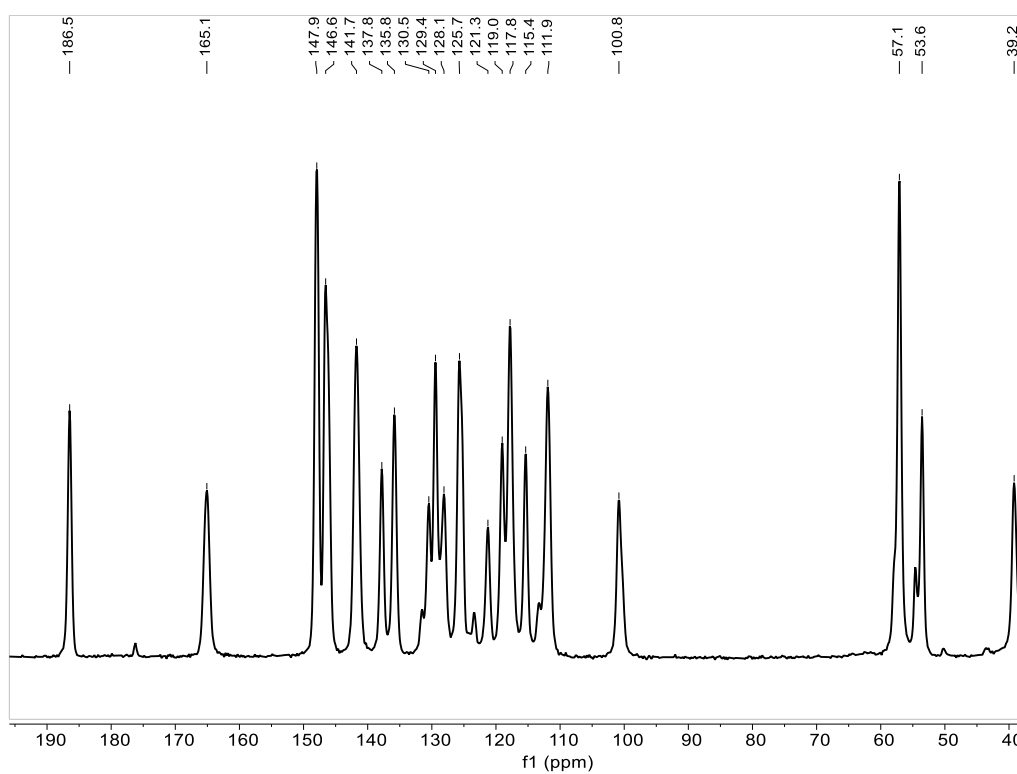
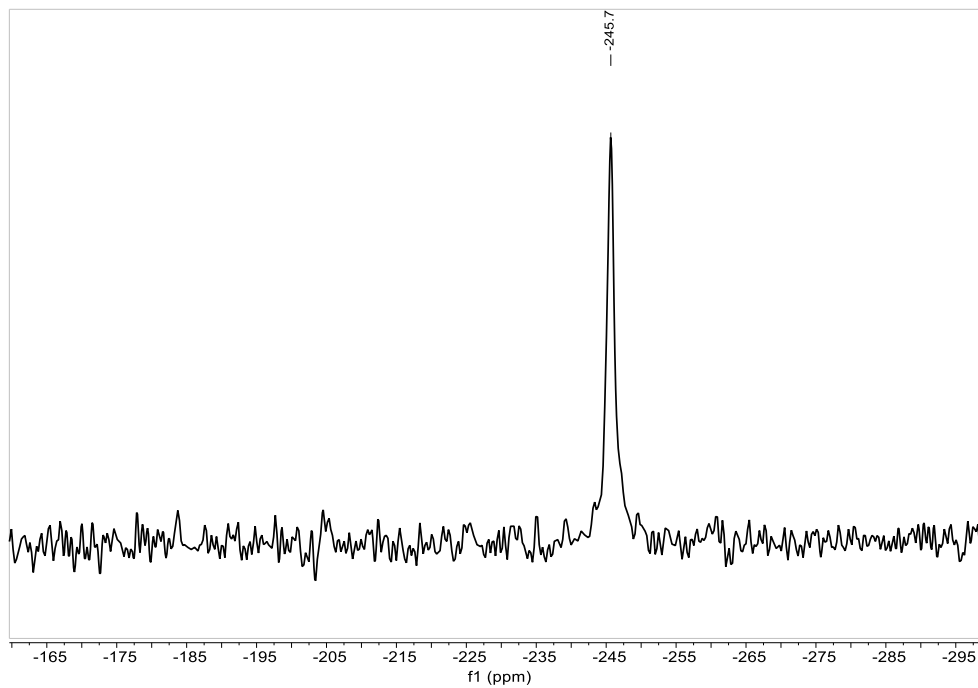


Figure S55:  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR spectrum



**Figure S56:**  $^{15}\text{N}$ -CPMAS NMR spectrum

# APLICACIÓN DE LA SIMULACIÓN DE MONTECARLO PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO SEGÚN LOS PRINCIPIOS DE LA CALIDAD POR DISEÑO (QBD)

## APPLICATION OF THE MONTECARLO SIMULATION FOR RISK ASSESSMENT IN THE DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD ACCORDING TO THE PRINCIPLES OF QUALITY BY DESIGN (QBD)

**Fernando Ferrándiz Vindel**

Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia  
Departamento de Acceso – GlaxoSmithKline, S.A., 28760 Tres Cantos (Madrid)

**corresponding author:** ferrandiz.gonzalez@gmail.com

### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

#### RESUMEN

La simulación de Montecarlo es una poderosa herramienta para identificar factores influyentes e intervalos en los que realizar los ensayos de desarrollo analítico aunque, al tratarse de un modelo matemático, debe ser confirmada experimentalmente.

Los resultados obtenidos y presentados en el trabajo confirman que dicha herramienta permite el análisis previo de las fuentes de variabilidad analítica y su importancia dentro de la fase de análisis de riesgos. Con ello, la confirmación experimental posterior debe centrarse exclusivamente en el uso de las variables puestas en evidencia con la simulación de Montecarlo, ahorrando así recursos y tiempo que no aportan valor al proceso global del desarrollo analítico.

#### ABSTRACT

*Montecarlo simulation is a powerful tool to identify influencing factors and intervals in which to carry out analytical development tests, although as it is a mathematical model, it must be experimentally confirmed. The results obtained and presented in the work confirm that this tool allows the previous analysis of the sources of analytical variability and its importance within the risk assessment phase. With this, the subsequent experimental confirmation must be mainly focused on the use of the variables revealed with the Montecarlo simulation, saving resources and time that do not add value to the global process of analytical development.*

#### Palabras Clave:

Simulación de Montecarlo  
QbD  
método analítico

#### Keywords:

Montecarlo simulation  
QbD  
analytical method



## 1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de los principios de la Calidad por Diseño en el desarrollo y validación de métodos instrumentales de análisis (Analytical QbD o AQbD) está creciendo exponencialmente desde los primeros trabajos en el año 2007 (1-16), por lo que se puede afirmar que se trata del estándar actual de trabajo. Aunque las Guías ICH actuales no contemplan directamente el uso de la metodología QbD en el ámbito analítico, la nueva Guía Q14 aún en borrador y la simultánea revisión de la Guía Q2 (17), ambas en fase de consulta pública, tienen como objetivo la incorporación de estos procesos de una manera oficial.

No obstante, a pesar de no existir un procedimiento estandarizado de trabajo, a lo largo de estos años se ha venido utilizando total o parcialmente el esquema de trabajo descrito por Borman et al (1) estructurado en seis pasos secuenciales con denominaciones adaptadas al ámbito analítico:

- Stage 1: Definición del Perfil Analítico Diana (Analytical target Profile - AtP)
- Stage 2: Determinación de los Atributos Críticos del Método (Critical Method Attributes - CMA)
- Stage 3: Evaluación de Riesgos (Risk assessment)
- Stage 4: Determinación de la Región de Diseño Operativa del Método (Method Operable Design Region - MODR)
- Stage 5: Determinación de la Estrategia de Control
- Stage 6: Gestión del Ciclo de Vida

Si bien todos los "stages" tienen siempre un componente basado en la experiencia del desarrollador o en una revisión sistemática de la literatura científica existente, al Stage 3 (Evaluación de Riesgos) se le añade el hecho de que también la imaginación del desarrollador tiene un papel importante, al intentar determinar todos los factores potenciales de variabilidad analítica que pueden afectar a los CMA. Es de destacar que el borrador de la Guía Q14 da una gran importancia a la Evaluación de Riesgos y la asocia directamente al conocimiento del proceso analítico.

Puesto que la determinación experimental del MODR en el Stage 4 mediante herramientas estadísticas como el Diseño de Experimentos (DoE) está basada en los parámetros considerados en el Stage 3, puede darse la circunstancia de que se estén gastando recursos y tiempo sin aportar valor al proceso global. Esto hace que resulte necesario disponer de herramientas que proporcionen información previa sobre la validez de los parámetros que se pretende utilizar. En este sentido, la simulación de Montecarlo se posiciona como una de las metodologías de elección para el análisis previo de las fuentes de variabilidad analítica (18).

La simulación de Montecarlo es un método estadístico basado en la repetición de características, combinaciones de características y comportamientos de un sistema real, ya sea este físico o

no, de manera que sea posible imitar el comportamiento de variables reales para analizar o predecir cómo van a evolucionar. Es evidente que, ante la necesidad de disponer de un número estadísticamente significativo de repeticiones y combinaciones para que el análisis tenga validez, la simulación de Montecarlo requiere el uso de sistemas informáticos para poder obtener información en un tiempo razonablemente breve.

La utilización de la simulación de Montecarlo en AQbD es relativamente frecuente en la literatura científica, aunque lo habitual es que se aplique para confirmar la MODR, es decir, como soporte al Stage 4 (19-22).

A diferencia de esta aproximación, el presente trabajo pretende demostrar la utilidad de la simulación de Montecarlo como complemento del Stage 3, es decir de la propia Evaluación de Riesgos, dentro del desarrollo de un método analítico según QbD. Concretamente se trata del estudio de la preparación cuantitativa de las muestras (pesada y disolución) de una formulación dermatológica para su análisis por viscosimetría clásica, precisamente por ser uno de los pasos que más variabilidad aporta al conjunto del proceso analítico.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Inicialmente se realizó una identificación de las fuentes de variabilidad aplicables a este paso analítico, entre todas las definidas en el Step 3, así como su distribución estadística siguiendo los principios del Teorema del Límite Central para datos continuos (23). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Hay que tener en cuenta dos aspectos importantes relacionados con algunas variables:

- Para el peso de la muestra se simplificó el modelo considerando que se pesa la cantidad exacta que indica el método analítico (límite superior) y que, por las características de la muestra, se pierde una parte en el proceso de transferencia cuantitativa a los matraces aforados (límite inferior) como previamente había demostrado el propio desarrollo experimental del método;
- El material de vidrio es de clase B como primera aproximación, con el fin de comprobar si es necesario o no pasar a utilizar vidrio clase A, dependiendo de los resultados obtenidos.
- Al tratarse de un valor numéricamente muy pequeño, el coeficiente de dilatación del vidrio a 20 °C empleado corresponde al vidrio común, habiéndose evitado el uso del coeficiente del vidrio borosilicato, mucho menor en valor, para poder amplificar la respuesta de una posible variación de volumen del material de vidrio provocada por la temperatura del laboratorio.

**Tabla 1.** Distribuciones estadísticas de las fuentes de variabilidad según el del Teorema del Límite Central.

Variables	Intervalos de valores	Origen	Distribución (23)
Variación de peso de producto en matraz	9,40-10,00 g (volumen 100 mL)	Desarrollo experimental del método analítico	Uniforme
	9,90-10,00 g (volumen 100 mL)		
	4,20-5,00 g (volumen 50 mL)		
	4,90-5,00 g (volumen 50 mL)		
Volumen del matraz	100 mL – 50 mL	Desarrollo experimental del método analítico	Triangular
Clase de matraz	100 mL clase B: $\pm 0,20$ mL	Norma DIN ES ISO 1042	Triangular
	50 mL clase B: $\pm 0,12$ mL		
Temperatura media del laboratorio	20,5 °C (invierno sin climatización)	Desarrollo experimental del método analítico	Uniforme
	27,5 °C (verano sin climatización)		
Variación de llenado	$\pm 0,2$ mL	Desarrollo experimental del método analítico	Uniforme
Coeficiente dilatación vidrio ( $\alpha$ 20 °C)	0,000099	Valor del vidrio común	Fijo
Pureza producto	Constante (se asume = 1)	N/A	Fijo
Incertidumbre de la balanza	$\pm 0,00404$	Certificado de calibración de la balanza	Uniforme

Se determinó la interconexión de estas fuentes y su relación tanto gráfica como matemática, con la finalidad de construir un modelo informático, adaptado de Burgess (18), sobre el que aplicar intervalos numéricos reales basados en el propio desarrollo analítico y en experiencias anteriores, con el fin de realizar un número adecuado de combinaciones y repeticiones de cálculos. El esquema resultante se muestra en la figura 1.

Posteriormente, se determinaron criterios de aceptación o límites para los resultados relativos a la concentración final de la muestra, de manera que fuera posible decidir qué factores deben ser incluidos en un DoE y qué intervalos deben ser utilizados para determinar el MODR relativo a la preparación cuantitativa de muestras. Estos criterios de aceptación, tentativos en el momento de realizar los ensayos, fueron  $\pm 1\%$  sobre valor nominal y  $\pm 1,5 \%$  sobre valor nominal.

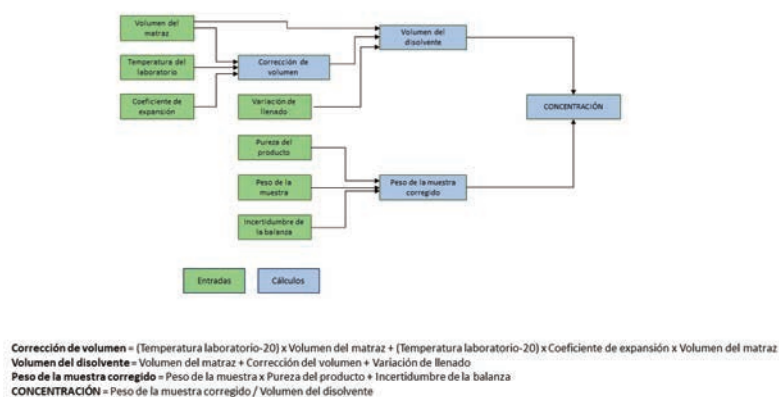


Figura 1. Esquema para la construcción del modelo informático



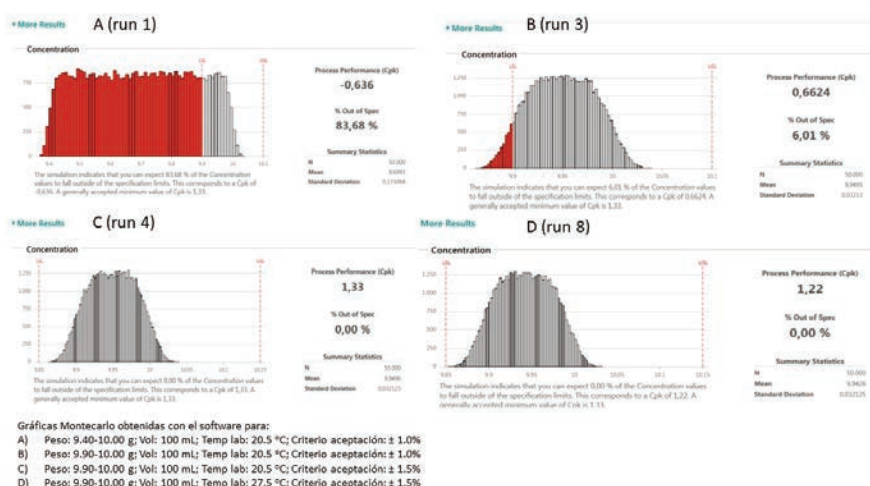


Figura 2. Gráficas de distribución de las concentraciones obtenidas con el modelo de Simulación de Montecarlo utilizado

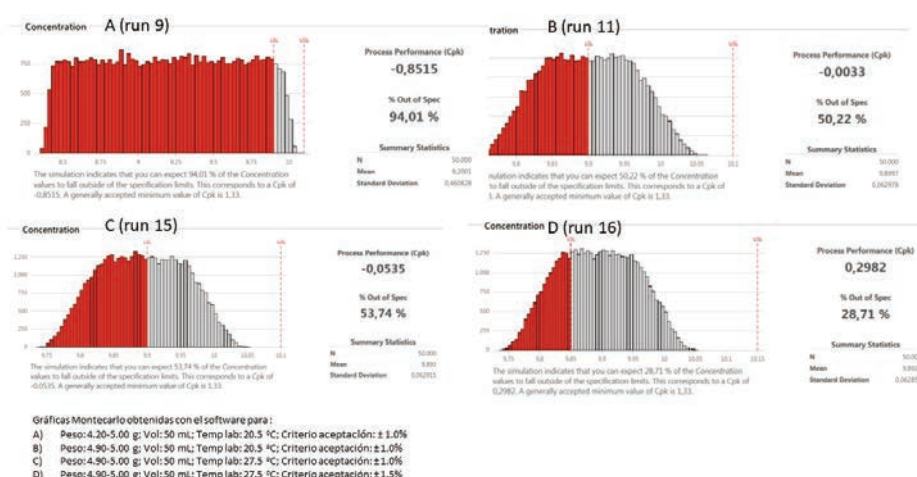


Figura 3. Gráficas de distribución de las concentraciones obtenidas con el modelo de Simulación de Montecarlo utilizado

Se determinó un número de combinaciones  $N=50000$  y se hizo correr este modelo con el software MINITAB DEVIZE.

Finalmente, los resultados obtenidos con el modelo fueron procesados mediante un diseño de experimentos (DoE) factorial de cuatro factores y dos niveles de manera que fuera visible una superficie de respuesta y sobretodo, los efectos de esos cuatro factores y sus interacciones. Para ello se utilizó el software DESIGN EXPERT.

### 3. RESULTADOS

En las figuras 2 y 3 se muestran, a modo de ejemplo, algunas de las gráficas de distribución de las concentraciones obtenidas con el modelo de Simulación de Montecarlo utilizado y las tablas 2 y 3 resumen todos los resultados obtenidos en cada una de las situaciones planteadas.

En la figura 4 se muestra un diagrama con los efectos de los factores estudiados mediante un DoE, de sus interacciones y de su significación estadística. Por su parte, en la figura 5 se muestra

la superficie de respuesta obtenida al procesar los datos obtenidos con el modelo en un DoE, manteniendo constantes los factores con menor efecto, es decir, la temperatura de laboratorio y las especificaciones. Para esta últimas, se fijó el valor 1.5 %, por ser este el nivel en el que se obtienen los resultados mejores.

### 4. DISCUSIÓN

Los Criterios de Aceptación utilizados para esta simulación tuvieron en cuenta el Error admisible en el método analítico completo, determinado a su vez a partir del cálculo de su incertidumbre de medida y establecido en un valor porcentual  $\leq 2.0\%$ , es decir, superior a los valores utilizados en la simulación de Montecarlo. Los Cpk determinados por el software intentan mostrar a través de un valor numérico si un proceso (en este caso la preparación de muestras para análisis) puede cumplir consistentemente unos intervalos previamente establecidos (en este caso 1.0 o 1.5 %), teniendo en cuenta que si el  $Cpk > 1.33$  el proceso es capaz, si está

**Tabla 2.** Resultados para volumen de 100 mL

Ensayo	Intervalo pesos (g)	Temperatura laboratorio (°C)	Criterios de aceptación (%)	% Out of spec	Cpk
1	9.40-10.00	20.5	$\pm 1.0$	83.68	-0.636
2	9.40-10.00	20.5	$\pm 1.5$	75.07	-0.473
3	9.90-10.00	20.5	$\pm 1.0$	6.01	0.6624
<b>4</b>	<b>9.90-10.00</b>	<b>20.5</b>	<b><math>\pm 1.5</math></b>	<b>0.00</b>	<b>1.33</b>
5	9.40-10.00	27.5	$\pm 1.0$	84.62	-0.6415
6	9.40-10.00	27.5	$\pm 1.5$	76.10	-0.5033
7	9.90-10.00	27.5	$\pm 1.0$	10.21	0.5713
<b>8</b>	<b>9.90-10.00</b>	<b>27.5</b>	<b><math>\pm 1.5</math></b>	<b>0.00</b>	<b>1.22</b>

**Tabla 3.** Resultados para volumen de 50 mL

Ensayo	Intervalo pesos (g)	Temperatura laboratorio (°C)	Criterios de aceptación (%)	% Out of spec	Cpk
9	4.20-5.00	20.5	$\pm 1.0$	94.01	-0.8515
10	4.20-5.00	20.5	$\pm 1.5$	90.84	-0.8022
11	4.90-5.00	20.5	$\pm 1.0$	50.22	-0.0033
12	4.90-5.00	20.5	$\pm 1.5$	23.35	0.3501
13	4.20-5.00	27.5	$\pm 1.0$	94.23	-0.8567
14	4.20-5.00	27.5	$\pm 1.5$	91.29	-0.8019
15	4.90-5.00	27.5	$\pm 1.0$	53.74	-0.0535
16	4.90-5.00	27.5	$\pm 1.5$	28.71	0.2982

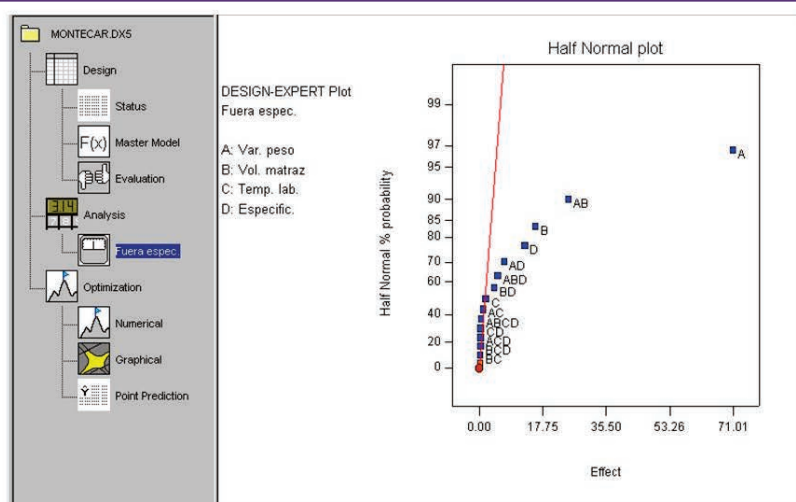
comprendido entre 1 y 1.33 es marginalmente capaz y si es  $< 1$ , el proceso es incapaz (24).

Atendiendo a estos criterios estadísticos, los resultados de la simulación muestran que sólo cuando el intervalo de pesos está comprendido entre 9.90 y 10.00 g, con un volumen de solución de 100 mL y un criterio de aceptación de  $\pm 1.5\%$ , el proceso tiene capacidad adecuada.

Este hecho queda corroborado con la ausencia de resultados fuera de especificaciones.

Como se observa en la tabla 3, ninguno de los resultados obtenidos con un volumen de 50 mL muestra Cpk o % Out of spec aceptables.

En estas condiciones, resulta evidente que la representación gráfica de la superficie de respuesta de los datos procesados mediante el DoE (figura 5 incluyendo ampliación) no aporta información adicional y confirma los resultados presentados en la tabla 2. Sin embargo, el cálculo de los efectos que se muestra en la representación gráfica de la figura 4 indica que la variación de peso



**Figura 4.** Diagrama con los efectos de los factores estudiados y de sus interacciones

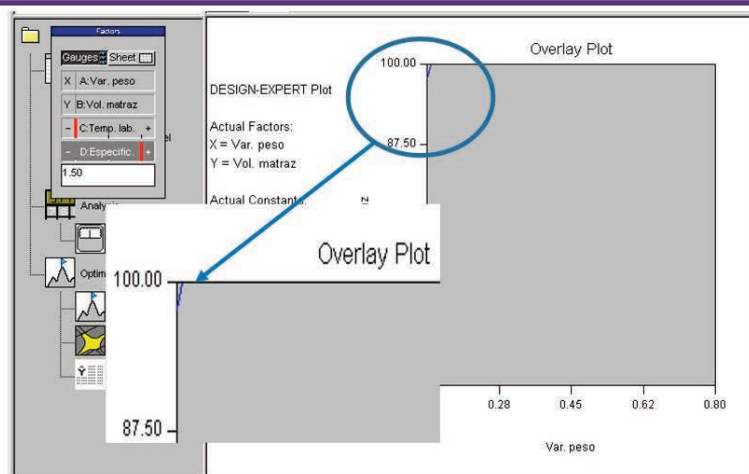


Figura 5. Superficie de respuesta obtenida al procesar los datos obtenidos con el modelo

tiene un efecto mayor que el resto de los factores y que este efecto es estadísticamente significativo. El siguiente efecto corresponde a la interacción entre la variación de peso y el volumen del matraz, siendo el efecto del resto de factores bajo y, en muchos casos, no significativo.

Por lo tanto, cualquier confirmación experimental de los resultados obtenidos mediante esta simulación de Montecarlo debe tener en cuenta necesariamente la variación de peso en el intervalo 9.90 - 10.00 g para un volumen de 100 mL, sin que sea necesario incluir la temperatura del laboratorio.

En todo caso, los datos obtenidos muestran que el uso de material clase B es aceptable para este tipo de análisis.

## 5. CONCLUSIONES

La simulación de Montecarlo es una poderosa herramienta para identificar factores influyentes e intervalos en los que realizar los ensayos de desarrollo analítico, pero, puesto que se trata de un modelo matemático, debe ser confirmada experimentalmente y en el entorno del proceso analítico completo, no sólo de la preparación de la muestra.

En cualquier caso, los resultados obtenidos confirman que la simulación de Montecarlo es una herramienta muy útil en el entorno QbD analítico, especialmente en el Stage 3, ya que permite el análisis previo de las fuentes de variabilidad analítica y su importancia.

El desarrollo experimental posterior, necesario para la confirmación de la simulación y, por lo tanto, para el proceso QbD analítico, debe centrarse exclusivamente en el uso de las variables puestas en evidencia con la simulación de Montecarlo (en particular, la variación de peso de la muestra objeto de análisis), ahorrando así recursos y tiempo que no aportan valor al proceso global del desarrollo analítico.

## 6. REFERENCIAS

1. Borman P, Nethercote P, Chatfield M, Thompson D, Truman K. The Application of Quality by Design to Analytical Methods. *Pharm Tech* 2007; 31; 10: 142-152.
2. Alessandro M, Little T, Fleitman J. Method Validation by Design to Support Formulation Development. *Pharm Tech Europe* 2013; 25; 4: 48-54.
3. Department of Health and Human Services. U.S Food and Drug Administration. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century — A risk-based approach. Final Report. Disponible en: (<https://www.fda.gov/media/77391/download>).
4. Little T. Assay Development and Method Validation Essentials. *BioPharm International* 2012; 25; 11: 48-51.
5. LoBrutto R. An Insight into Analytical Quality by Design in the Pharmaceutical Industry. *The Column* 2013; 9; 15: 14-7.
6. Nethercote P, Ermer J. Quality by Design for Analytical Methods. *Pharm Tech Europe* 2012; 24; 10: 52-6.
7. Burgess C. Calibration of Instruments: Is Your UV Spectrometer Accurate Enough? *Pharm Tech* 2014; 38; 1: 56-9.
8. Burgess C. Evaluating Risk-Based Specifications for Pharmaceuticals. *Pharm Tech Europe* 2013; 25; 7: 30-6.
9. Chambers D, Guo G, Kleintop B, Rasmussen H, Deegan S, Nowak S, Patterson K, Spicuzza J, Szulc M, Tombaugh K, Trone M, Yua-bova Z. GMPs for Method Validation in Early Development. An Industry Perspective (Part II). *Pharm Tech Europe* 2012; 24; 8: 26-32.
10. Rignall A, Christopher D, Crumpton A, Hawkins K, Lyapustina S, Memmesheimer H, Parkinson A, Smith MA, Wyka B, Kaerger S. Quality by Design for analytical methods for use with orally inhaled and nasal drug products. *Pharm Tech Europe*, 2008; 29; 10: 24-31.



11. Embase® (página de inicio de Internet). Disponible en: (<https://www.embase.com/>).
12. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Pubmed® (página de inicio de Internet). Disponible en: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).
13. American Chemical Society (ACS) Publications (página de inicio de Internet). Disponible en: (<https://pubs.acs.org/>).
14. Ferrándiz F. Aplicación de la Calidad por Diseño (Quality by Design) en el desarrollo y validación de métodos analíticos. Discurso de ingreso. Academia de Farmacia de Castilla y León 2014.
15. McDowall D. Life Cycle and Quality by Design for Chromatographic Methods. LC-GC Europe 2014; 27; 2: 91-7.
16. Ferrándiz F. Aplicación de la calidad por diseño (QbD) en el desarrollo de un método de análisis de eritrocitos humanos por citofluorimetría: comparación con la metodología de desarrollo tradicional. An Real Acad Farm 2020; 86; 4: 237 – 256.
17. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Final Concept Paper ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation dated 14 November 2018. Endorsed by the Management Committee on 15 November 2018. Disponible en: ([https://database.ich.org/sites/default/files/Q2R2-Q14\\_EWG\\_Concept\\_Paper.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2R2-Q14_EWG_Concept_Paper.pdf)).
18. Burgess C Measurement Uncertainty without the Math. Pharm Tech Europe 2016; 28; 2: 38-42.
19. Jena BR, Panda SP, Umasankar K, Swain S, Koteswara Rao GSN, Damayanthi D, Ghose D, Pradhan DP. Applications of QbD-based Software's in Analytical Research and Development. Current Pharm Anal 2021; 17; 4: 461-473.
20. Sha'at M, Florin A, Stoleriu I, Bujor A, Stamate Cretan M, Hartan M, Ochiuz L. Implementation of QbD Approach to the Analytical Method Development and Validation for the Estimation of Metformin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms by HPLC. Pharmaceutics 2022; 14; 6: 1187.
21. Beg S, Suman Panda S, Katore OP, Singh B (2017) Applications of Monte-Carlo simulation and chemometric techniques for development of bioanalytical liquid chromatography method for estimation of rosuvastatin calcium. J Liquid Chromat & Related Tech, 2017; 40; 18: 907-920.
22. Furlanetto S, Orlandini S, Pasquini B, Del Bubba M, Pinzauti S. Quality by Design approach in the development of a solvent-modified micellar electrokinetic chromatography method: Finding the design space for the determination of amitriptyline and its impurities. An Chim Acta 2013; 802: 113-124.
23. Burgess C Distribution of Data: The Central Limit Theorem. Pharm Tech Europe 2019; 31; 10: 50-1.
24. Capability statistics for Between/Within Capability Sixpack en Minitab 18 Support Disponible en : (<https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/capability-analysis/how-to/capability-sixpack/between-within-capability-sixpack/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/capability-statistics/>).

Si desea citar nuestro artículo:  
**Aplicación de la Simulación de Montecarlo para la evaluación de riesgos en el desarrollo de un método analítico según los principios de la calidad por diseño (QBD).**

Fernando Ferrandiz Vindel  
An Real Acad Farm [Internet].  
An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 369-375  
DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.03>



# NANOMETROLOGÍA Y NANOANALÍTICA: ANOTACIÓN EN EL CONTEXTO BIOANALÍTICO Y NANO(BIOMÉDICO)FARMACÉUTICO

## NANOMETROLOGY AND NANOANALYTICS: ANNOTATION IN THE BIOANALYTICAL AND NANO(BIOMEDICAL)PHARMACEUTICAL CONTEXT

**Agustín García Asuero**

Académico de número (electo) de la Real Academia Nacional de Farmacia

Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla

**corresponding author:** asuero@us.es

### REVISIÓN

### RESUMEN

En esta anotación se abordan los conceptos de nanometrología y nanoanalítica resaltando la importancia de las medidas y su trazabilidad metrológica a nanoescala. Se hace hincapié en la naturaleza interdisciplinar tanto de la química analítica como de la nanotecnología. Esto requiere aunar los esfuerzos de diferentes campos, e.g. química, medicina, farmacia, biología, ingeniería de la ciencia de los materiales, para afrontar con garantía los retos que se plantean en frentes diversos. Se comentan algunos apuntes acerca de los nanomateriales y nanopartículas de interés en el contexto bioanalítico y farmacéutico. En lo que respecta a los agentes terapéuticos, los nanomedicamentos ayudan a superar las limitaciones de solubilidad, permeabilidad, biodisponibilidad, y toxicidad de los enfoques convencionales, abriendo las puertas a las terapias de precisión y a la medicina personalizada. Siendo uno de los objetivos de la química analítica la realización de análisis a escala nanométrica, también juega un papel como actor aportando su granito de arena en el concierto colectivo que tiene como misión la salvaguarda de la salud humana.

### ABSTRACT

*This annotation addresses the concepts of nanometrology and nanoanalytics, highlighting the importance of measurements and their metrological traceability at the nanoscale. The interdisciplinary nature of both analytical chemistry and nanotechnology is emphasized. This requires joining the efforts of different fields, e.g. chemistry, medicine, pharmacy, biology, materials science engineering, to face with guarantee the challenges that arise on different fronts. Some notes about nanomaterials and nanoparticles of interest in the bioanalytical and pharmaceutical context are commented. When it comes to therapeutic agents, nanomedicines help overcome the solubility, permeability, bioavailability, and toxicity limitations of conventional approaches, opening the door to precision therapies and personalized medicine. Being one of the objectives of analytical chemistry to carry out analysis at the nanometric scale, it also plays a role as an actor do your bit in the collective concert whose mission is to safeguard human health.*

#### Palabras Clave:

nanometrología  
nanoanalítica  
nanomedicina

#### Keywords:

nanometrology  
nanoanalytics  
nanomedicine





## 1. INTRODUCCIÓN

Compete a la metrología analítica de los nanomateriales suministrar información fidedigna que ayude a afrontar los problemas de diversa índole que se plantean en la caracterización y control de calidad de los nanomateriales en términos de dimensiones y atributos permitiendo la trazabilidad metodológica que engloba a equipos, productos y procesos, con objeto de que se puedan así superar las barreras que operan en contra de sus aplicaciones en el mundo real, e.g. clínicas. La caracterización de las interacciones entre los nanomateriales y biosistemas es fundamental de cara al desarrollo de nanomedicinas terapéuticas y de elementos de diagnósticos eficientes. En esta anotación se perfila el papel de la nanometrología, siendo también la nanoanalítica objeto de tratamiento y estudio. El desarrollo de métodos y estrategias analíticas ha contribuido a la evolución de la nanotecnología, al aportar la química analítica soluciones diversas en el ámbito de los nanomateriales. Estos poseen características específicas, controlándose además los fenómenos que transcurren a escala diminuta con dificultad. Los materiales mesoporosos nanoestructurados de sílice están adquiriendo una gran notoriedad. Los nanomateriales y las nanopartículas están innovando multitud de sectores industriales siendo la evaluación de potenciales riesgos asociados de una honda preocupación social. Un "primer" sobre nanomateriales y nanopartículas en el que se incide en su rol analítico da paso a su uso en el ámbito biomédico. Las limitaciones intrínsecas de las terapias convencionales han impulsado notablemente el desarrollo de la nanomedicina. Los sistemas de liberación controlada de fármacos dominan la nanomedicina, al superar los problemas (solubilidad, permeabilidad, disponibilidad) que afectan a los agentes convencionales, aunque la regulación debe necesariamente evolucionar al ritmo en que lo hace la investigación nanotecnológica. El revolucionario concepto de laboratorio en un chip de aplicaciones analíticas suministra una detección personalizada en el punto de atención. El novedoso concepto de medicina personalizada o de precisión tiene como objeto personalizar el tratamiento en función de los atributos personales del paciente. La nanomedicina continúa su andadura como campo multidisciplinario que integra la biomedicina con las ciencias fisicoquímicas, la tecnología farmacéutica y la ingeniería de administración de empresas con objeto de mejorar la atención médica y la medicina personalizada en beneficio de la humanidad. La química analítica está también abonada a esta causa.

## 2. NANOMETROLOGÍA

Nanometrología es un término usado desde finales de los años 80 por Virdee (1). Nakayama et al., del Laboratorio Nacional e Investigación en Metrología del Japón, utilizan este término en 1992 en conexión con medidas de precisión encaminadas a la de-

terminación de constantes fundamentales y comprobación de la teoría física relacionada con el espaciado de la red de silicio y el cuanto de flujo magnético (2, 3). La nanometrología es la tecnología de medición necesaria para investigar, desarrollar y verificar las características de medición de objetos o características de objetos (instrumentos y patrones de materiales) con una incertidumbre expresada en unidades de nanómetros o incluso menores (4, 5). En particular, la nanometrología adopta conceptos de los campos del análisis del tamaño de partículas y de la química-física, entre otros. En 2005, el Instituto de Física (IOP) del Reino Unido dedicó un número especial de la revista "*Measurement Science and Technology*" a la nanometrología, conteniendo ocho artículos que cubrían sus aspectos relevantes (6, 7). La necesidad de evaluar la incertidumbre del procedimiento a nanoescala antes de adoptar una acción basada en la medición, es obvia. Ha de establecerse por tanto en las Normas ISO una ruta claramente definida desde las unidades SI hasta la medición en la muestra, que permita la caracterización de materiales en términos de dimensiones y de atributos como masa y propiedades eléctricas (8-10). Las compañías farmacéuticas pronto querrán utilizar ingredientes que tendrán que medirse en términos de muy pocas millonésimas e incluso billonésimas de gramo, para lo que es necesario estar preparados para pesar esas sustancias con ese tipo de precisión (2). Las nuevas revoluciones tecnológicas en ciencias, i.e. Industria 4.0, 2ª revolución cuántica, internet de las cosas (IoT), y campos de creciente expansión como los de la nanotecnología o la biotecnología exigen mediciones mucho más exactas y fiables (2).

La nanometrología debe contemplarse como una parte indispensable de cada tipo de nanotecnología. Toda actividad en el ámbito de la ciencia y la tecnología debe vincularse con mediciones de referencia con objeto de garantizar que los resultados cuantitativos sean comparables y los productos intercambiables (2). Esta trazabilidad metodológica establecida, que lleva aparejada una adecuada estandarización para permitir la calibración de equipos y la evaluación de la conformidad de nuevos productos y procesos, se crea y supervisa por los organismos pertinentes "*National Physical Laboratory*" (NPL, Reino Unido), NIST o "*Physikalisch-Technische Bundesanstalt*" (PTB, Alemania) (11). La legislación (armonizada) centrada en la nanotecnología está experimentando un cambio a nivel mundial, ya que la estandarización deja de ser voluntaria para convertirse en obligatoria (12). El proyecto Co-Nanomet de la Comisión Europea constituye un ejemplo de la importancia de la nanometrología en el control de calidad a nanoescala (13). Las actividades y logros de la estrategia y política industrial de la Unión Europea hacen referencia al desarrollo de: i) nanotecnología dimensional; ii) nanotecnología química; iii) nanotecnología de película delgada; iv) nanotecnología mecánica; v) nanotecnología de materiales estructurados; vi) nanotecnología eléctrica; vii) nanotecnología biológica; y viii) simulación y modelado para nanotecnología.



### 3. NANOANALÍTICA

La química analítica dedicada a los objetos nanométricos ha sufrido un considerable desarrollo en las dos últimas décadas (14-15). La evolución de la nanotecnología en sí se ha producido en parte gracias al desarrollo de los métodos y estrategias analíticas consiguientes (16). El término "nanoanalítica", propuesto por Zolotov en 2007, se ha relacionado en general con el campo del análisis de microáreas de superficie, interfaz y películas finas (17). La "caracterización de nanomateriales" puede entenderse como un enfoque de rutina con cierto énfasis en la precisión de los instrumentos y las habilidades prácticas personales, en comparación con la "nanoanalítica", en la que prima el conocimiento fundamental de desarrollo y validación de metodologías, física, química, bioquímica y nanociencia. La caracterización robusta y precisa de las interacciones entre los materiales de nanoingeniería y los biosistemas, por ejemplo, es vital para el desarrollo de nanomedicinas terapéuticas y de diagnóstico seguras y eficientes (18).

El progreso global en el ámbito de los nanomateriales híbridos (orgánicos/ inorgánicos) hace posible disponer de dispositivos de laboratorio en chip, sistemas analíticos miniaturizados ( $\mu$ -TAS), dispositivos de microfluidos, bioensayos basados en nanopartículas, biosensores electroquímicos, y dispositivos para monitoreo clínico y ambiental (14). Dichos adelantos son difíciles de imaginar sin las soluciones que aporta la química analítica. La interconexión de nanosensores y nanodispositivos con Internet ha llevado al desarrollo de un estándar de última generación basado en la IoT denominado "Internet de las nanocosas" (IoNT) (19). La producción en masa de sistemas basados en nanotecnología pone en adición de relieve las limitaciones físicas de variadas técnicas de caracterización, ya que los nanofenómenos que transcurren a esa diminuta escala se controlan con dificultad (14). Es por lo que han de definirse con claridad determinadas funciones descriptivas de los nanoobjetos y metodologías analíticas relacionadas con la nanocaracterización de dichos materiales, así como la estimación de su trazabilidad y las estrategias de validación consiguientes (14). Dado los aspectos multidisciplinarios de la nanociencia y la nanotecnología no todos los grupos de investigación tienen fácil acceso a una amplia gama de instalaciones de caracterización. Muy a menudo se hace necesario un enfoque de caracterización integral, lo que requiere la combinación de técnicas de forma complementaria (20). En este contexto, es deseable conocer las limitaciones y fortalezas de las diferentes técnicas, para saber si en algunos casos el uso de solo una o dos de ellas es suficiente para brindar información confiable al estudiar un parámetro específico (por ejemplo, tamaño de partícula). El contar con directrices adecuadas para la elección de ensayos o plataformas nanoanalíticas para la caracterización completa de nanomateriales sigue siendo un reto (15).

La nanoanalítica se mueve en tres direcciones: (i) aplicación de varios tipos de nanotecnologías en química analítica; (ii) aplicación de diversos nanoobjetos como herramientas de análisis químico; (iii) análisis químico de los propios nanoobjetos mediante métodos químicos y físicos y los correspondientes problemas metrologógicos (14, 21-23). En el nanoanálisis se distinguen principalmente dos estrategias conceptuales diferentes, la primera engloba los métodos para estudiar la morfología o composición exclusivamente elemental de muestras de base nano. Otra estrategia menos utilizada en nanoanalítica y nanoanálisis consiste en combinar varias funciones en una metodología (14). Este segundo supuesto permite estudiar la composición química de las superficies de base nano combinada idealmente con un estudio de su morfología de una manera integral, e.g. (24).

La necesidad de contar con una definición de las actividades relacionadas con la caracterización de nanoobjetos se debe a las características analíticas específicas de estos frente a los enfoques convencionales (25). La nanoanalítica, en una primera aproximación, contempla dos ámbitos: (i) el primero hace referencia a los métodos de caracterización y observación de nano-objetos, (ii) el segundo, utiliza nano-objetos o nanoestructuras con el fin de desarrollar nuevas herramientas para el estudio de analitos que no son específicamente nanoobjetos (26). Este último apartado se relaciona con nanosensores, electrodos nanoestructurados o nanocanales cromatográficos para análisis elemental o biomolecular (15-16). El desarrollo de dicha instrumentación se encuentra condicionado por la caracterización previa de los nanocomponentes de estos sistemas. Así, en todos los casos, la nanoanalítica implica la caracterización de nanoobjetos, definiéndose el rango de investigación asociado desde el sub-nanómetro hasta el micrómetro.

En este rango, resulta posible no solo la caracterización de los nano-objetos, sino también el estudio de su comportamiento. En particular, se pueden investigar todos los fenómenos que conducen a un cambio de tamaño: disociación (nanoobjetos nanoensamblados), disolución (nanopartículas inorgánicas), degradaciones (especialmente para nanofibras / nanotubos, nanopartículas compuestas o estructuradas y cualquier objeto de materia "soft"), aglomeración / agregación entre nanoobjetos, etc (26). La estrategia de investigación debe permanecer abierta al análisis elemental y molecular en el compartimento disuelto. Los enfoques nanoanalíticos y analíticos convencionales se complementan, constituyendo los primeros una parte integral de la química analítica. Uno de sus capítulos, la creación y desarrollo de métodos y herramientas utilizados en el estudio de los nanoobjetos (e.g. microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica de túnel de barrido, etc ) interesa a los expertos en nanomateriales y nanotecnologías (27). El objetivo del otro es utilizar nanoestructuras para la creación de nuevas herramientas para el análisis químico en las condiciones habituales,



e.g., columnas monolíticas con nanocanales para cromatografía. Las nanopartículas de oro con superficies modificadas ya se utilizan en diferentes métodos de análisis (26). También se han propuesto numerosos sistemas de administración de fármacos con posibles aplicaciones clínicas basados en nanopartículas de oro, aunque aún no han sido objeto de comercialización (28).

La naturaleza interdisciplinar de la química analítica no puede dejar de lado el poder de atracción y los avances de la nanotecnología (29). La resultante es la aparición del término “nanoanalítica”; una ojeada a la bibliografía aboga por la definición que sigue: “La nanoanalítica es una parte de la química analítica que desarrolla los principios y métodos de aplicación de las nanotecnologías y las propiedades inusuales de los objetos nanométricos en el análisis químico (30)”. Conforme a esta definición podemos identificar y comprender cuáles son los problemas y cómo resolverlos teniendo en cuenta el concepto, los elementos y las peculiaridades de la nanoanalítica. En la Tabla 1 se muestran algunas de las definiciones propuestas de la nanoanalítica (17, 26, 30-32). La importancia de estos temas queda reflejada en las jornadas, congresos y *Workshops* que tienen lugar sobre nanotecnología analítica, farmacéutica y biomédica, como se muestra en la Tabla 2. Rios et al. han introducido el término “metrología analítica para nanomateriales”, que trata con las medidas que tienen como objeto el nano mundo con propósitos analíticos (23, 33). Los principios de la metodología son idénticos como hemos subrayado en la sección previa, pero necesitan ser adaptados a las situaciones particulares de medida de los nanomateriales.

#### 4. NANOMATERIALES Y NANOPARTÍCULAS EN EL ÁMBITO BIOANALÍTICO Y FARMACÉUTICO

Los nanomateriales se pueden clasificar según su origen en naturales, incidentales o antropogénicos y fabricados de forma intencional (2). Conforme a su naturaleza se dividen en orgánicos, inorgánicos e híbridos. En lo que respecta a su dimensión son cero-dimensionales, unidimensionales, bidimensionales o tridimensionales y atendiendo a su estructura pueden ser homogéneos y heterogéneos. Las aplicaciones de nanomateriales y nanopartículas se hacen patentes en muchas áreas: electrónica, catálisis, fotocatalisis, óptica, biología y medicina... Una prueba reciente es el éxito conseguido con los nanovectores de administración en las vacunas COVID-19.

El término “*engineered material*” se usa para describir materiales fabricados por el hombre producidos en nanoescala (34-36). Los nanomateriales más comúnmente usados son nanopartículas, puntos cuánticos, puntos de carbono, grafeno, nanotubos de carbono y nanocompuestos (nanocomposites) que han encontrado uso en diferentes aplicaciones bioanalíticas tales como diagnóstico, biosensores, liberación de fármacos, imagen y terapia fototérmica en cáncer (37). Aprovechar las propiedades novedosas y las dimensiones favorables de los nanomateriales es de vital importancia en las técnicas analíticas en las que se desea una mayor sensibilidad, menores tiempos de análisis, mayores eficiencias en la extracción y pequeños impactos ambientales (38). Estas propiedades distintivas de los nanomateriales se han utilizado para mejorar aplicaciones in-

Tabla1. Algunas de las definiciones de “nanoanalítica”

Autor	Definición
Sergei Shtykov (31)	La nanoanalítica es una parte de la ciencia de diagnóstico que construye los estándares y técnicas para la aplicación de las nanotecnologías y las propiedades sorprendentes de los objetos de tamaño nanométrico en el examen sintético.
S. Faucher et al. (26)	La nanoanalítica es una disciplina científica que desarrolla y aplica métodos, instrumentos y estrategias para obtener información sobre la composición química y la naturaleza física y química de la materia en forma de objetos de tamaño nanométrico, en el espacio y el tiempo, así como sobre el valor de estas mediciones, es decir, su incertidumbre, validación y/o trazabilidad de acuerdo con estándares fundamentales.
S. Shtykov (30)	La nanoanalítica es un área de la química analítica que desarrolla los principios y métodos de aplicación de las nanotecnologías y las propiedades específicas de los objetos a nanoescala en el análisis químico.
S. Shtykov (32)	La nanoanalítica es una parte de la química analítica que desarrolla los principios y métodos de aplicación de las nanotecnologías y las propiedades inusuales de los objetos de tamaño nanométrico en el análisis químico.
Yu.A. Zolotov (17)	La nanoanalítica consta de dos partes. Una de ellas interesa, en primer lugar, a los expertos en nanomateriales y nanotecnologías, ocupándose de la creación y desarrollo de métodos y herramientas utilizadas en el estudio de nanoobjetos, como la microscopía de fuerza atómica, la microscopía electrónica de barrido de túnel y otras. El objeto de la segunda parte es utilizar nanoestructuras para la creación de nuevas herramientas para el análisis químico en condiciones habituales.

**Tabla 2.** Jornadas, Congresos o Workshops seleccionados sobre Nanotecnología Analítica, Farmacéutica y Biomédica

Conferencia / Congreso / Taller	Fecha	País
6 <sup>th</sup> edition of World Nanotechnology Conference. Pharmaceutical Nanotechnology	April 24-26 (2023)	Orlando (FL-USA)
International Conference on Nanobiotechnology and Pharmacy	February 11-12 (2023)	Kuala Lumpur (Malasia)
4 <sup>th</sup> International Conference on Pharmaceutical Nanotechnology and Nanomedicine. Bionanointeractions and nanotoxicology	16-17 Sept (2022)	Richmond (VA-USA)
International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology X NyNA	5-8 Sept (2022)	Ciudad Real (España)
6 <sup>th</sup> International Conference: Analytical and Nanoanalytical Methods for Bio-medical and Environmental Samples IC-AMBES 2022	June 8-10 (2022)	Brasov (Romania)
2 <sup>nd</sup> International Nanoscale Analytical Workshop	May 18-21 (2022)	Munich (Germany)
ALTECH 2021 – Analytical Techniques for Precise Characterization of Materials. Nanomaterial and Advanced Characterization.	May 31- June 3 (2021)	Groningen (The Netherlands)
11 th European and Global Summit for Clinical Nanomedicine, Targeted Delivery and Precision Medicine. The Building Blocks to Personalized Medicine	Sept 2-5 (2018)	Basel (Switzerland)
Nanoanalytics Workshop, Techniques, Methods and Applications & ICAN	Nov. 17-18 (2016)	University of Duisburg-Essen (Germany)

novadoras en la preparación, separación y detección de muestras en química analítica.

La sensibilidad y la relación señal-ruido de muchos sensores químicos mejoran significativamente con el uso de nanomateriales (39). Entre los nanomateriales fluorescentes estudiados, los puntos de carbono (carbon dots, CD) han atraído una atención cada vez mayor debido a sus notables ventajas en términos de características de imagen, elevada carga de fármacos y baja toxicidad, y por tanto han pasado a ser los candidatos más atractivos en el campo de la teranóstica guiada por imágenes (40). Encuentran asimismo aplicación en el campo de los sensores, en la foto/electrocatalisis y en técnicas de separación (41-42). En nanotecnología se trabaja hoy con nanopartículas, particularmente nanotubos de carbono, como adsorbentes en fases estacionarias cromatográficas, dotándolas de funciones diversas o como componentes de polímeros (43-44). Los nanomateriales son importantes en el desarrollo de enfoques analíticos sensibles y selectivos para la detección de múltiples dianas, en particular patógenos, contaminantes ambientales y biológicos, sustancias peligrosas, drogas de abuso y marcadores biológicos asociados con enfermedades (45). Es de prever que las nanozimas (enzimas artificiales) combinadas con amplificación de

señales sustituyan a las enzimas, más costosas, en el desarrollo de ensayos sensibles y específicos para alimentos (45).

El uso del término nanopartícula comenzó a hacerse patente en los campos de la inmunología y farmacia antes que en el de química (46-47). En 1979 Jörg Kreuter et al. describen nanopartículas de poli(metil-2-14C-metacrilato) en referencia a partículas orgánicas poliméricas para liberación de fármacos. La respuesta biológica a los nanomateriales depende de muchos factores (nivel de exposición, acumulación sistémica o perfiles de excreción, distribución de tejidos y órganos, y la edad del sujeto), que deben tenerse en cuenta al diseñar nanomateriales para uso clínico con el objetivo de minimizar la toxicidad de las nanopartículas (47-48). La nanomedicina tiene como objeto “averiguar el seguimiento, control, construcción, separación, diferencia y mejora integral de todos los sistemas biológicos humanos, trabajando desde el nivel molecular utilizando dispositivos y nanoestructuras diseñados, en última instancia, para lograr un beneficio médico (47-49). Desde 1989, el número de aplicaciones y productos farmacéuticos aprobados basados en nanotecnología ha aumentado de forma significativa. En las últimas dos décadas, unos ochenta productos de nanomedicina han sido aprobados para su comercialización por la Administración de



Drogas y Alimentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (50). Las nanoestructuras comercializadas actualmente incluyen nanocristales, liposomas y nanopartículas lipídicas, nanofármacos poliméricos PEGilados, otros polímeros, nanopartículas basadas en proteínas y nanopartículas basadas en metales (51). Los sistemas de administración de fármacos dominan ahora la nanomedicina, con ingresos que representan más del 75 % de las ventas totales, superando los problemas de solubilidad, permeabilidad, disponibilidad y toxicidad que supone el uso de los agentes convencionales, que adolecen de una farmacocinética deficiente (52). Tras tres décadas, los liposomas son todavía las plataformas de más éxito comercial: "It is important to continue pushing grand challenges and engaging in some level of blue skies research that can propel the field forward" (53). Por otra parte, la medicina personalizada o de precisión es un concepto novedoso que tiene como objetivo individualizar/ personalizar el manejo terapéutico en función de los atributos personales del paciente (54). Las nanopartículas permiten superar las barreras biológicas (sistémicas, microambientales y celulares) que son heterogéneas entre las poblaciones de pacientes y las enfermedades, a través de terapias de precisión, en las que las intervenciones personales han mejorado la eficacia terapéutica (34).

Existe un interés creciente en el ámbito de la investigación biomédica por los materiales sílice mesoporosos nanoestructurados, campo en el que María Vallet-Regí et al. han destacado de manera muy especial (48, 55-59). Estas biocerámicas bioactivas y biocompatibles permiten regenerar tejidos óseos y actúan también como sistemas de liberación controlada. Es necesario modificar químicamente la superficie de los nanomateriales y nanopartículas para que no sean eliminadas por el sistema inmunológico. Se favorece así la adsorción de biomoléculas (péptidos), proteínas o factores de crecimiento. En el diseño de biomateriales inteligentes el fármaco se libera bajo un estímulo externo. Se está en el camino de adecuar las propiedades favorables de estos materiales mesoporosos nanoestructurados a la resolución de problemas clínicos reales.

Los polímeros impresos molecularmente son materiales altamente reticulados que tienen regiones de unión específica a una molécula deseada (60). Entre sus diversas formas físicas (monolitos, geles, membranas, partículas en micro y nano escala) las nanopartículas con impresión molecular han llamado la atención de los investigadores dada su fácil preparación y cinética de reconocimiento rápida hacia el compuesto objetivo (61). En adición los polímeros impresos molecularmente se pueden preparar en nanoescala como materiales compuestos utilizando nanopartículas, nanotubos de carbono, grafeno y arcilla (62).

Los nanomateriales están innovando multitud de sectores industriales, aunque las consecuencias de su exposición aún no se han establecido claramente. La evaluación de los riesgos potenciales para la salud humana y el medio ambiente derivados de la expo-

sición a las nanopartículas es un tema de preocupación social (63-65). Donaldson et al. acuñó por primera vez en 2004 el término nanotoxicología, enfocado al estudio de la toxicidad inducida por nanopartículas (65). Las metodologías analíticas usadas en la valoración de la toxicidad han sido objeto de revisión (66).

En la nanobioelectrónica los nanomateriales se aplican a la determinación de biomoléculas, y es un campo en rápido desarrollo destinado a integrar nano y biomateriales con transductores electrónicos (44, 67). Estos incluyen los llamados dispositivos microfluídicos de laboratorio en un chip, bioensayos basados en nanopartículas, la detección bioelectrónica de biomoléculas, como ácidos nucleicos y proteínas, dispositivos de detección electroquímica para monitoreo clínico y ambiental, bioespecies in vivo, biosensores, etc. Estos desarrollos suponen una inestimable ayuda a la química analítica de cara a la búsqueda de soluciones adecuadas a los nuevos problemas y desafíos que se plantean de forma continua (68).

El progreso acelerado y las innovaciones llevadas a cabo en las aplicaciones bioanalíticas basadas en tecnología de telefonía móvil dan comienzo a una nueva era de asistencia sanitaria. Existen más de 5 mil millones de usuarios de teléfonos móviles en el mundo, por lo que el laboratorio de interfaz en un chip de aplicaciones bioanalíticas que utilizan teléfonos móviles es un concepto realmente revolucionario y proporciona una detección personalizada en el punto de atención del analito objetivo (69-72).

## 5. COMENTARIOS FINALES

La brecha existente entre la ciencia bioanalítica básica y las aplicaciones de la nanotecnología en el mundo real constituye un reto a superar (50, 73-74). La crisis que involucra la traducción de hallazgos científicos en un entorno de laboratorio a biomarcadores de enfermedad, potenciales tratamientos y aplicaciones clínicas es real (75). El Valle de la Muerte (VoD) refleja una serie de desafíos a los que se enfrentan las empresas de base tecnológica durante sus primeras etapas de desarrollo (76). La adopción de iniciativas y el establecimiento de estrategias de cooperación internacional facilita a la industria farmacéutica la travesía del VoD. El desarrollo del área confronta también desafíos significativos a nivel regulatorio (77-81). El colapso financiero, los costes elevados asociados con el proceso de I + D, el acceso complicado a los fondos, la incertidumbre sobre los rendimientos esperados y los extensos procesos regulatorios gubernamentales no disuaden a los inversores. Esto sugiere que la nanomedicina tiene ante sí un futuro brillante y en expansión pudiendo decirse que ha alcanzado la mayoría de edad (82).

La regulación debe necesariamente evolucionar; dado que la investigación en nanotecnología va más rápido que la dinámica de la regulación, la brecha entre ellos es cada vez mayor. Tanto la



FDA como la EMA son miembros del "Innovation Task Force" (ITF), grupo internacional y multidisciplinario que incluye competencias científicas, regulatorias y legales para productos de nanotecnología. Si bien las agencias reguladoras establecen pautas para favorecer la traducción de los nanomateriales desde el "banco" hasta la "cabecera", pocas nanomedicinas consiguen superar esa brecha (83). Una mejor caracterización puede contribuir a superar los obstáculos al incrementar así el conocimiento global sobre el propio nanomaterial, reforzando en adición la confianza en términos de reproducibilidad de lote a lote de nanoobjetos tan complejos. Las demandas de información analítica sobre los nanomateriales, e.g. el "Sistema de Descripción Uniforme de Materiales a Nanoscala", Versión 2.0 (CODATA), el REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos) y el CPL (Clasificación, Etiquetado y Envasado) han dado lugar a la aparición de un campo especializado que involucra a la química analítica en gran medida, pero que es al mismo tiempo altamente interdisciplinar (84).

Las limitaciones intrínsecas de las terapias convencionales y la elevada mortandad de los casos de cáncer ha impulsado el desarrollo de la nanomedicina. El campo de la nanomedicina ha influido notoriamente en áreas de investigación tales como la administración de fármacos, el diagnóstico, la teranóstica y la medicina regenerativa, en la que los biomateriales tienen tanto que decir (48, 57). Los sistemas de liberación controlada superan la distribución sistémica inespecífica y las concentraciones inadecuadas de fármacos en el sitio del tumor, la citotoxicidad intolerable en tejido sano, y la resistencia a los fármacos (47-48, 85). Los intensos esfuerzos de los investigadores de diferentes campos de la ciencia, como la química, la medicina, la farmacia, la biología y la ingeniería de la ciencia de los materiales, creando un circuito de retroalimentación entre el banco (*bench*) y el mercado (*market*), contribuirán a hacer disponibles comercialmente en un futuro los productos basados en nanomateriales en ciencias bioanalíticas y de atención médica. Como comenta recientemente Carmen Avendaño en los *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (en referencia a los Premios Nobel de 2015) la Biología invade la Química y la Química invade la Medicina (86). Una cita de Paul Langevin (1872-1946), físico francés, nos recuerda que corresponde al científico una importante misión: "If we did not do our scientific work someone else would; but if we neglected our social responsibilities as scientists, there would soon be no science" (87).

La Química Analítica en particular también se enfrenta a problemas y retos de una enorme trascendencia. George Whitesides (*Google Scholar*; citas 379.881, índice-h: 282, índice i-10: 1481), químico especialista en "soft lithography" (litografía suave con el uso de materiales elastómeros) se declara admirador de la Química Analítica, y recientemente en 2013 ha dicho: "La química analítica es extremadamente importante, probablemente incluso más impor-

tante de lo que creen los químicos analíticos. Todo en ciencia requiere medición; los químicos analíticos son expertos en la ciencia de la medición, no solo en determinar las estructuras de moléculas y la composición de mezclas de moléculas" (88). La capacidad de analizar nanopartículas se desarrolla a la par que la fabricación de estas. Esto significa que, para fabricar nanomateriales reproducibles para el análisis, es fundamental poder realizar análisis a escala nanométrica, pudiendo la química analítica aportar en este sentido su granito de arena (21, 33, 45, 89-90).

## 6. REFERENCIAS

1. Virdee MS. Nanometrology of optical flats by laser autocollimation. *Surf Topogr* 1988; 1: 415-425.
2. Asuero, AG. Química y Medida: de los orígenes a la miniaturización y a la nanotecnología (una perspectiva histórica de la Química Analítica). Sevilla: Editorial Universidad de Sevilla; 2022. 657 p.
3. Nakayama K, Tanaka M, Shiota F, Kuroda K. Precision physical measurements and nanometrology. *Metrologia* 1992; 28 (6): 483-502.
4. Teague EC. Nanometrology. *Proc AIP Conf* 1992: 371-407
5. Kunzmann H. Nanometrology at the PTB. *Metrologia* 1991/92; 28 (6): 443-453.
6. Graham D. Nanometrology - is it the next big thing in measure? *Analyst* 2007; 132 (2): 95-96.
7. Postek MT. Nanometrology (Editorial). *Meas Sci Technol* 2005; 16 (11): E01. 1p.
8. Ledesma ARG, de Almeida MFL. Nanometrology, standardization and regulation of nanomaterials in Brazil: a proposal for an analytical-prospective model. *J Technol Manag Innov* 2013; 8: 39-53 (Special Issue Supp 1).
9. Forsberg E. The role of ISO in the governance of nanotechnology. *WRI Work Research Institute of Norway* 2010: pp 1-76.
10. Fang F, Zhang N, Guo D, et al. Towards atomic and close-to-atomic scale manufacturing. *Int J Extrem Manuf* 2019; 1(1): 012001. 33 p.
11. Devasahayam S. Overview of an internationally integrated nanotechnology governance. *Int J Metrol Qual Eng* 2017; 8: 3-12.
12. Mansfield E, Kaiser DL, Fujita D, Van de Voorde M (Eds). *Metrology and Standardization of Nanotechnology: Protocols and Industrial Innovations*, Wiley: New York, 2017.
13. Co-Nanomet Co-ordination of Nanometrology in Europe. *European Nanometrology 2020. Seventh Framework Programme*; www.euspen.eu/nanometrology
14. Semenova D, Silina YE. The role of nanoanalytics in the development of organic-inorganic nanohybrids-seeing nanomaterials as they are. *Nanomaterials* 2019; 9: 1673. 24 p.





15. Lespes G. Nanoanalytics: analytical methods characterization of nano- and micro-objects. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26 (6): 5235-5237.
16. Zolotov Yu A. Nanoanalytics. *J Anal Chem* 2010; 65 (12): 1207-1208.
17. Zolotov Yu A. Analytical chemistry: the day today. *J Anal Chem* 2007; 62 (10): 912-917.
18. Mahmoudi M. The need for robust characterization of nanoparticle for nanomedicine applications. *Nat Commun* 2021; 12, 5246. 16 p.
19. Nayyar A, Puri V, Le D-N. Internet of Nano Things (IoNT): Next evolutionary step in nanotechnology. *Nanosci Nanotechnol* 2017; 7(1): 4-8.
20. Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh, NTK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* 2018; 10: 12871. 64 p.
21. Valcarcel M. Las nanoestructuras de carbono en la nanociencia y nanotecnología analítica. Madrid: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; 2010. 226 p.
22. López-Lorente I, Valcárcel, M. The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: involvement of nanotools and nanooanalytes in the sample process. *TrAC Anal Chem* 2016; 75: 1-9.
23. Soriano ML, Zougragh M, Valcárcel M, Rios A. Analytical nanoscience and nanotechnology: where we are and where we are heading. *Talanta* 2018; 177: 104-121.
24. Surangy H, Jayawardena N, Liyanage SH, Rathnayake K, Patel U. Analytical methods for characterization of nanomaterial surfaces. *Anal Chem* 2021; 93(4): 1889-1911.
25. Valcárcel M, Simonet BM, Cárdenas S. Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391(5): 1881-1887.
26. Faucher S, Le Xoustumer P, Lespes G. Nanoanalytics: history, concepts and specificities. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26 (6): 5267-5281.
27. Zolotov, Yu A. Some new, promising directions in analytical studies. *J Anal Chem* 2008; 63 (7): 677.
28. Wang W, Wang J, Ding Y. Gold nanoparticle-conjugated nanomedicine: design, construction and structure-efficacy relationship studies. *J Mater Chem B* 2020; 8 (22), 4813. 18p.
29. Sharma D, Kanchi S, Bisetty K, Nuthalapati VN. Perspective on analytical sciences and nanotechnology. En *Advanced Environmental Analysis: Applications of Nanomaterials*. Vol. 1 Hussain CM, Kharisov B (Eds), Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2017, Chapt 1, 3-34.
30. Shtykov S. Nanoanalytics: definitions, classification, history, and primary advances. En *Nanoanalytics. Nanoobjects and Nanotechnologies in Analytical Chemistry*, Shitykov S (Ed), Berlin: De Gruyter, 2018.
31. Shtykov S. Nanoanalytics — A reply of analytical chemistry to the era of nanotechnology. *J Clin Bioanal Chem* 2020 4(3).
32. Shtykov S. Nanoanalytics — A reply of analytical chemistry to the era of nanotechnology. *J Anal Bioanal Tech* 2014; 5: 35.
33. Lopez-Sanz S, Guzman Bernardo FJ, Martin-Doimeadios RCR, Rios A. Analytical metrology for nanomaterials: present achievements and future challenges. *Anal Chim Acta* 2019; 1059: 1-15.
34. Mitchel MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev* 2021; 20: 101-124.
35. Albalawi F, Hussein MZ, Fakurazi S, Masarudin MJ. Engineered nanomaterials: the challenges and opportunities for nanomedicines. *Int J Nanomed* 2021; 16: 161-184.
36. Zhao H, Wang Y, Bao L, Chen C. Engineering nano-bio interfaces from nanomaterials to nanomedicines. *Acc Mater Res* 2022, 3, 812-819.
37. Keçili, R, Büyüktiryaki S, Hussain M. Advancement in bioanalytical science through nanotechnology: past, present and future. *TrAC Anal Chem* 2019; 110: 259-276.
38. Canals A, Ahmadi M. Magnetic nanomaterials in analytical chemistry. *Talanta* 2021; 235: 122762.
39. Valentini F, Palleschi G. Nanomaterials and analytical chemistry. *Anal Lett* 2008; 41(4): 479-520.
40. Chen BB, Liu ML, Huang CZ. Recent advances of carbon dots in imagen-guided theranostics. *TrAC Anal Chem* 2021; 134: 116116.
41. Chen J, Gong Z, Tang W, Row KH, Qiu H. Carbon dot in sample preparation and chromatographic separation: recent advances and future prospects. *TrAC Anal Chem* 2021; 134: 116135.
42. de Andres F, Rios A. Carbon dots — separative techniques: tools-objective towards green analytical methodology focused on bioanalysis. *Microchem J* 2021; 161: 105773.
43. Valcarcel M, Lopez-Lorente AI. Recent advances and trends in analytical nanoscience and nanotechnology. *TrAC Anal Chem* 2016; 84: 1-2.
44. Karayannis MI, Efstathiou CE. Significant steps in the evolution of analytical chemistry — Is the today's analytical chemistry only chemistry? *Talanta* 2012; 102: 7-15.
45. Chang H-T. Grand challenges in analytical sciences. *Fr Anal Sci* 2021; 1: 725070.
46. Park HJ, Shin DJ, Yu J. Categorization of quantum dots, clusters, nanoclusters, and nanodots. *J Chem Educ* 2021; 98 (3): 703-709.
47. Alonso Fernández MJ. De la Farmacia Galénica a la Nanomedicina. Discurso de ingreso como Académico de Número, Academia de Farmacia de Galicia, Santiago de Compostela, 28 abril de 2010. 100 p.



48. Vallet M. Fármacos, Nanomedicina y Biomateriales: un objetivo común, Discurso de la Excm. Sra. D<sup>a</sup> María Vallet Regí. Leído en la sesión del día 27 de octubre de 2011 para su ingreso como Académica de Número, Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, 2011. 80 p.
49. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine -challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; 48(5): 872-897.
50. Halwani AA, Development of pharmaceutical nanomedicines: from bench to the market. *Pharmaceutics* 2022; 14(1): 106. 21 p.
51. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roozantan A, Karimi M, Hamblin M. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine (Lond)* 2019, 14(1): 93-126.
52. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T, Tan W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* 2012, 7(8): 1253-1271.
53. Nel AE. Transformational impact of nanomedicine: reconciling outcome with promise. *Nano Lett* 2020; 20: 5601-5603.
54. Alghamdi MA, Fallica AN, Virzi N, Kesharwani P, Pittalà V, Greish K. The promise of nanotechnology in personalized medicine. *J Pers Med* 2022, 12 (5), 673. 36 p.
55. Vallet-Regí M, Schüth F, Lozano D, Colilla M, Manzano M. Engineering mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: where are we after two decades? *Chem Soc Rev* 2022; 51(13): 5365-5433.
56. Vallet-Regí M. Our contributions to applications of mesoporous silica nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 2022; 537: 44-52.
57. Vallet-Regí M. Evolution of biomaterials. *Front Mater Sci* 2022; 9: Article 864016. 5 p.
58. Colilla M, Izquierdo-Barba I, Rodríguez-Donoso GP, Otmamendi-Vallet N. Commemorative issue in honor of Professor Maria Vallet-Regí: 20 years of silica-based mesoporous materials. *Pharmaceutics* 2022; 12, 125. 6 p.
59. Gisbert-Garzarán M, Vallet-Regí M. Nanoparticles for bio-medical applications. *Nanomaterials* 2022; 12: 1189. 3 p.
60. Sajini T, Mathew B. A brief overview of molecularly imprinting polymers: highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting. *Talanta Open* 2021; 4: 100072. 20 p.
61. Hussain CM. Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry. *Modern Trends in Analysis*, Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 82.
62. Keçili R, Hussain CM. Recent progress of imprinted nanomaterials in analytical chemistry. *Int J Anal Chem* 2018: Article ID 8503853. 18 p.
63. Radomska A, Leszczyszyn J, Radomski MW. The nanopharmacology and nanotoxicology of nanomaterials: new opportunities and challenges. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25(1): 151-162.
64. Reagen S, Zhao JX, Analysis of nanomaterials on biological and environmental systems and new analytical methods for improved detection. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 6331 (12 pp).
65. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. Nanotoxicology *Occup Environ Med* 2004; 61(9): 727-728.
66. Caballero-Díaz E, Valcarcel M. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. *TrAC Anal Chem* 2016; 84: 160-171.
67. Zhang A, Lieber CM. Nano-bioelectronics. *Chem Rev* 2016; 116 (1): 215-257.
68. Adams F, Adriaens M. The metamorphosis of analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 2020; 412 (15): 3525-3537.
69. Quesada-Gonzalez D, Merkoçi A. Mobile phone-based biosensing: an emerging “diagnostic and communication” technology. *Biosens Bioelectron* 2017; 92: 549-562.
70. Kanchi S, Sabela MI, Mdluli PS. Smartphone based bioanalytical and diagnostic application: a review. *Biosens Bioelectron* 2018; 102: 126-149.
71. Vahist SK, Mudanyali O, Schneider EM, Zengele R, Özcan A. Cell-phone-based devices for bioanalytical sciences. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406 (14): 3263-3277.
72. Ding X, Mauk MG, Yin K, Kadimisetty K, Liu C. Interfacing pathogen detection with smartphones for point-of-care applications. *Anal Chem* 2019, 91(1): 655-672.
73. Mignani D, Shi X, Rodrigues J, Roy R, Muñoz-Fernández A. Dendrimers toward translational nanotherapeutics: concise key step analysis. *Bioconjugate Chem* 2020; 31(9): 2060-2067.
74. Dordevic S, Gonzalez MM, Conejos-Sánchez, et al. Current hurdles to the translation of nanomedicines from bench to the clinic. *Drug Deliv Transl Res* 2022; 12(3): 500-525.
75. Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide — identification of problems and overcoming obstacles. *Transl Med Commun* 2019, 4, Article number 18. 19 p.
76. Gbadegeshin SA, Al Natsheh A, Ghafel K, Mohammed O, Kostela A, Rimpiläinen A, Tikkanen J, Kuoppala A. Overcoming the Valley of Death: a new model for high technology startups. *Sustainable Future* 2022; 4: 100077. 15 p.
77. Hussain CM, Keçili, R. Uses of nanomaterials for environmental analysis. En *Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutants*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 2020, pp 277-322.
78. Calabretta MM, Zhangheri M, Lopreside A, Marchegiani A, Montali L, Simoni P, Roda A. Precision medicine, bioanalysis and nanomaterials: toward a new generation of personalized portable diagnostics. *Analyst* 2020; 145(8): 2841-2853.
79. Mazayen ZM, Ghoneim AM, Elbatanony RS, Basalious EB, Bendas ER. Pharmaceutical nanotechnology: from the bench to the market. *Futur J Pharm Sci* 2022; 8(1): 12. 11 p.



80. Foulkes R, Man E, Thind J, Yeung S, Joy A, Hoskins C. The regulation of nanomaterials for clinical applications: current and future perspectives. *Biomater Sci* 2020; 8, 4653. 12 p.
81. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: principles, properties and regulatory issues. *Fr. Chem.* 2018, 6, Article 360. 15 p.
82. Asuero AG. Fullerenos en Farmacia y Biomedicina ¿Realidad o deseo? La frontera azul. En “Nanotecnología Farmacéutica”. A. Ramos (Ed). Granada-Sevilla: Academia Iberoamericana de Farmacia; 2022.
83. Coty J-B, Vauthier C. Characterization of nanomedicines: a reflection on a field under construction needed for clinical translation success. *J. Control Release* 2018; 275: 254-268.
84. Labuda J. Analytical and bioanalytical chemistry of nanomaterials. *Vid Proc Adv Mater* 2020; 1: 2020.0823.
85. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release* 2016; 224: 86-102.
86. Avendaño Lopez MC. Nobel Prizes of Chemistry and Physiology or Medicine. Biology invades Chemistry and Chemistry invades Medicine. *Anal R Acad Farm* 2016; 82(2): 121-128.
87. Dickson D. The social responsibilities of the scientist. *Rev Phys Technol* 1971; 2(2): 116.
88. Whitesides GM. Is the focus on “Molecules” obsolete? *Annu Rev Anal Chem* 2013; 6: 1-29.
89. Ligler FS, White HS. Nanomaterials in analytical chemistry. *Anal Chem* 2013; 85 (23): 1161-1162.
90. Vauthier C. Issues related with the analysis of nanomaterials in analytical chemistry. En “Handbook of nanomaterials in analytical chemistry”, C.M. Hussain (Ed.), Amsterdam: The Netherlands: Elsevier 2020, Chapter 19, pp 473-490.

Si desea citar nuestro artículo:

**Nanometrología y nanoanalítica: anotación en el contexto bioanalítico y nano(biomédico)farmacéutico**

Agustín García Asuero

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 377-386

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.04>



# FÁRMACOS MULTIDIANA COMO UNA NUEVA ESTRATEGIA CONTRA LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

## MULTI-TARGET DRUGS AS A NEW STRATEGY AGAINST NEURODEGENERATIVE DISEASES

**José Carlos Menéndez**

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Unidad de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

**corresponding author:** josecm@farm.ucm.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas son de origen multifactorial, es decir, su etiología comprende una amplia serie de procesos patológicos interconectados. Como consecuencia, la enfermedad continúa su avance cuando se corrige uno solo de estos procesos de forma aislada, como se hace con las terapias actuales. Existen varias aproximaciones terapéuticas que pueden, en principio, ayudar a superar estas limitaciones y la más reciente y prometedora es la estrategia multidiana, en la que se buscan moléculas diseñadas racionalmente para que sean capaces de modular varias dianas terapéuticas asociadas a una enfermedad. En este artículo de revisión se exponen los fundamentos del diseño de agentes multidiana, que se aclararan mediante ejemplos tomados de la investigación que se lleva a cabo en el grupo del autor. Las principales dianas involucradas en este trabajo son diversas proteínas implicadas en la vía de señalización Nrf2-ARE, proteínas transportadoras de calcio y rho-quinasa 2.

#### ABSTRACT

*Neurodegenerative diseases are multifactorial in origin, i.e., their etiology involves a large number of interconnected pathological processes. As a consequence, disease progression cannot be efficiently stopped by modulating a single target, as done with current therapies. Several approaches attempt to overcome this limitation, and the most promising one is based on the use of multitarget drugs. This approach seeks molecules that are rationally designed to modulate several therapeutic targets associated to a particular disease. In this review article, the foundations of the design of multitarget drugs are summarized and illustrated through examples taken from work carried out in the group of the author. The main targets studied are proteins involved in the Nrf2-ARE pathway, calcium transport proteins and rho-kinase 2.*

#### Palabras Clave:

fármacos multidiana  
vía Nrf2-ARE  
proteínas transportadoras de calcio  
rho-quinasa 2

#### Keywords:

multitarget drugs  
Nrf2-ARE pathway  
calcium transport proteins  
rho-kinase 2

## 1. INTRODUCCIÓN

El diseño de fármacos tradicional busca compuestos de elevada potencia, selectivos hacia una única diana terapéutica. Puede considerarse que se inició con el concepto de la “bala mágica” de Paul Ehrlich, desarrollada en paralelo al concepto de receptor por Langley y el propio Ehrlich. Supone un enfoque reduccionista, en el que se asume que un sistema complejo, como los biológicos, puede reducirse a sus partes elementales sin considerar la complejidad asociada a la integración entre éstas. En esta aproximación, la falta de selectividad, es decir la capacidad de interacción con múltiples dianas, se considera una característica indeseada.

La aproximación “un fármaco, una diana” es, en principio, adecuada para el tratamiento de enfermedades asociadas a alteraciones en un solo gen, pero parece dar malos resultados en el caso de las enfermedades más complejas, de origen multifactorial. Entre ellas figuran las enfermedades neurodegenerativas, cuya etiología comprende una amplia serie de procesos patológicos interconectados. Como consecuencia, la enfermedad continúa su avance cuando se actúa únicamente sobre una diana aislada, como se hace con las terapias convencionales disponibles en la actualidad, ya que los sistemas biológicos son a menudo resistentes a alteraciones en un solo nodo de una red de procesos debido a la existencia de funciones redundantes y mecanismos compensatorios.

Para combatir las enfermedades multifactoriales, existe cada vez mayor interés en aproximaciones terapéuticas basadas en la modulación simultánea de varios mecanismos patológicos a través de estrategias de polifarmacología. La más sencilla consiste en la administración de varias moléculas que actúan de forma independiente en distintas dianas biológicas, y se emplea habitualmente en cáncer, VIH y enfermedades cardiovasculares, entre otras. Sin embargo, esta estrategia tiene varias limitaciones, que se resumen más abajo. Puede diferenciarse entre combinación de medicamentos, en la que los principios activos se administran en medicamentos diferentes, y asociación de fármacos, en la que todos los principios activos se administran simultáneamente en la misma forma farmacéutica.

## 2. LA ESTRATEGIA MULTIDIANA

### 2.1. Características de los fármacos multidiana

Para mantener la capacidad de modular simultáneamente varios mecanismos moleculares y reducir los riesgos asociados a la asociación de especies activas, están adquiriendo gran importancia los fármacos multidiana<sup>(1)</sup> que presentan varias ventajas sobre las asociaciones gracias al hecho de emplear una única molécula:

1. Se simplifica la farmacocinética, al no ser necesario sincronizar la actividad de varias especies.
2. Se simplifican los estudios toxicológicos y de seguridad.
3. Se simplifican los ensayos clínicos.
4. Desaparece el riesgo de interacciones entre fármacos.
5. Mejora el cumplimiento terapéutico (en comparación con las combinaciones de medicamentos).
6. Se evitan incompatibilidades en la fase de formulación farmacéutica (en comparación con las asociaciones de fármacos).
7. Aparecen nuevas posibilidades de diseño. Por ejemplo, se puede emplear un fragmento de la molécula para ayudar al transporte de otro.

Por otra parte, los fármacos multidiana tienen también algunas limitaciones:

1. La etapa de investigación es más complicada, ya que las moléculas deben verificar requisitos estructurales que permitan la interacción con más de una diana.
2. Aparecen requisitos de diseño adicionales como la necesidad de un perfil de actividad equilibrado entre las dianas implicadas, indispensable para que todas ellas puedan ser moduladas a la misma dosis.
3. Se pierde la posibilidad de extender la vida de la patente de un fármaco antiguo mediante una nueva combinación.

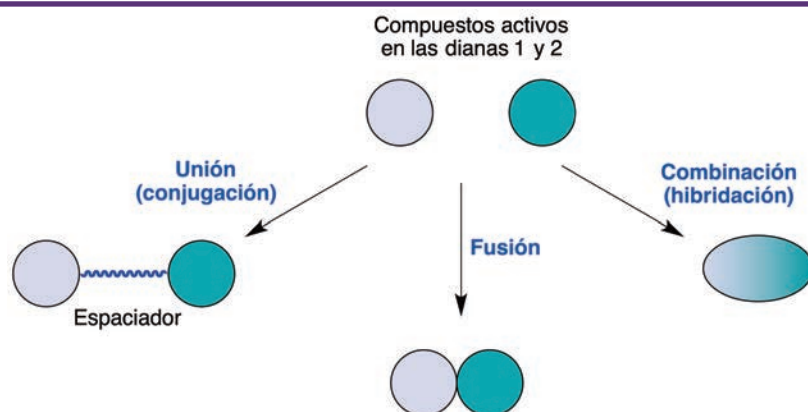


Figura 1. Modalidades del diseño de fármacos multidiana

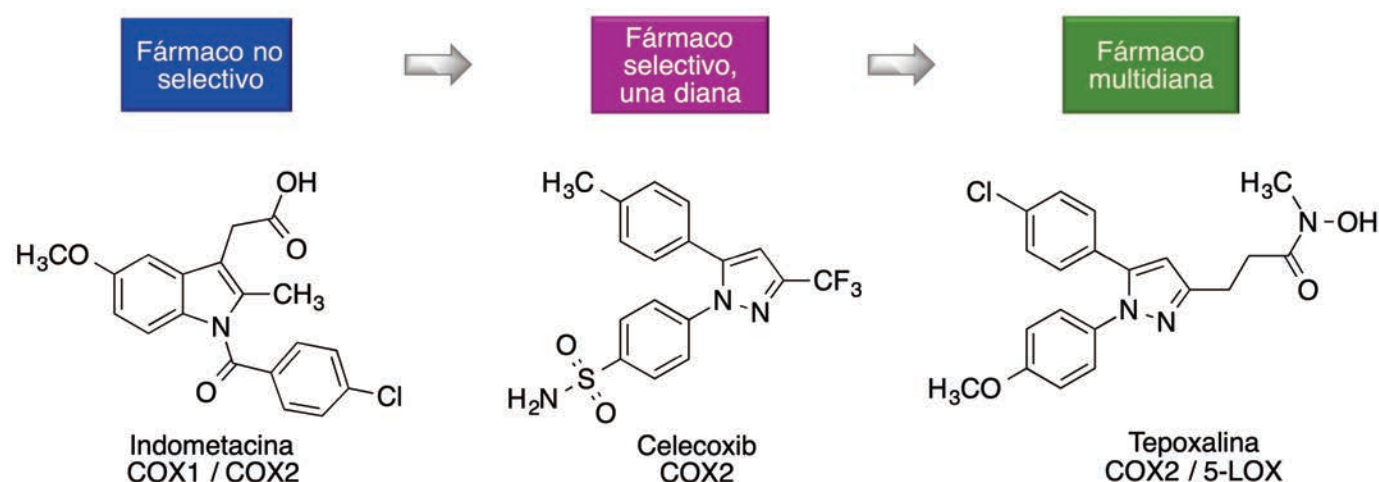


Figura 2. Los fármacos multidiana como una etapa de diseño más avanzada respecto a la búsqueda de selectividad

## 2.2. Criterios para el diseño de fármacos multidiana

El diseño racional de moléculas multidiana se basa en tres estrategias principales, que se describen como unión (conjugación), fusión y combinación (hibridación), que se esquematizan en la figura 1. La estrategia de unión requiere la presencia de los esqueletos responsables de la interacción con cada diana, así como de grupos funcionales que permitan su conexión por medio de un espaciador. Esta estrategia, en comparación con las otras, ofrece varias ventajas, entre ellas la de hacer más sencillo mantener la funcionalidad de los compuestos originales y por tanto conservar las interacciones con la diana de ambos farmacóforos. Además al no esperarse, en principio, grandes diferencias entre la actividad de los ligandos originales y la del compuesto multidiana, es probable que se necesiten menos ciclos de optimización para llegar al fármaco final. Como aspecto negativo, la unión de farmacóforos mediante un espaciador da lugar generalmente a compuestos de elevado peso molecular, lo que puede afectar negativamente a la biodisponibilidad oral y otras propiedades farmacocinéticas. Las estrategias de combinación y fusión son más adecuadas para mantener el peso molecular dentro de valores más moderados.

En muchos casos la búsqueda de fármacos multidiana se planifica como una etapa de diseño más avanzada que la búsqueda de selectividad. Puede encontrarse un ejemplo en la figura 2, en

la que se muestra la evolución de los inhibidores de ciclooxigenasa desde fármacos no selectivos entre COX1 y COX2, como la indometacina, a fármacos selectivos hacia COX2, como el celecoxib, y desde allí hacia compuestos multidiana, como la tepoxalina, diseñada como un inhibidor selectivo de COX2 capaz, además, de inhibir la lipooxigenasa 5 (2).

## 2.3. Criterios para la selección de dianas

Idealmente, las dianas seleccionadas deben tener la capacidad de modificar la enfermedad, no simplemente sus síntomas. En el caso de los fármacos multidiana, se considera preferible modular proteínas que presenten efectos sinérgicos o aditivos. A la hora de seleccionarlas, debe tenerse presente que el objetivo final no es bloquear o modular proteínas concretas, sino redes de procesos bioquímicos. Algunos de los criterios de selección de dianas con esta finalidad se resumen en la figura 3. Para agentes quimioterápicos, la estrategia adecuada es atacar los nodos de la red (puntos altamente interconectados), debiendo, obviamente, buscarse selectividad entre especies. Para restaurar una red alterada, que es la situación que se encuentra en tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, puede ser mejor estrategia modular varios puntos no cruciales de la red próximos a un nodo, para reducir toxicidad (3).

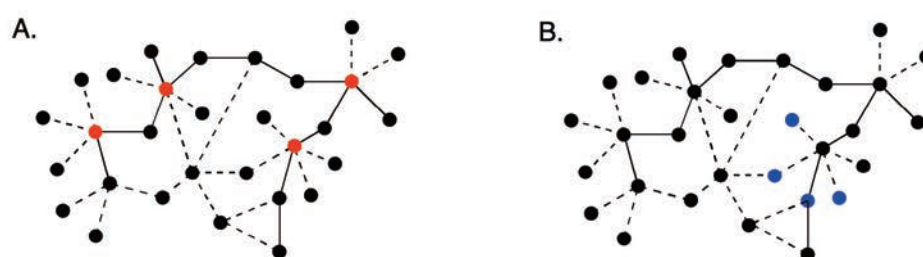


Figura 3. A. Estrategia multidiana en fármacos quimioterápicos. B. Selección de dianas para restaurar una red alterada de procesos bioquímicos

Algunos de los procesos clave en las enfermedades neurodegenerativas son:

1. Estrés oxidativo. Un mecanismo importante en el proceso de neurodegeneración y muerte cerebral está asociado a la generación de especies reactivas derivadas del metabolismo del oxígeno molecular, que es especialmente intenso en el sistema nervioso central. El estrés oxidativo es un factor común conectado a la patogenia de todas las enfermedades neurodegenerativas.
2. Neuroinflamación. La microglía constituye el sistema inmune primario del sistema nervioso central y se activa como consecuencia de alteraciones en la homeostasis fisiológica para destruir patógenos y eliminar células dañadas. La neuroinflamación es un estado reactivo de este sistema inmune, mediada por las propias células de glía y también por efectores moleculares solubles procedentes de ellas, como las citoquinas proinflamatorias. La neuroinflamación es crucial en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (4) y otros procesos neurodegenerativos (5).
3. Proteinopatías. Muchas enfermedades neurodegenerativas están asociadas a la formación de agregados de proteínas plegadas anormalmente, que resultan neurotóxicos (6).
4. Disfunción mitocondrial. A causa de sus elevados requerimientos energéticos, las neuronas son especialmente vulnerables a daños en sus mitocondrias. De hecho, las principales enfermedades neurodegenerativas están asociadas a disfunciones mitocondriales.
5. Alteraciones en ciertas vías de señalización celular.

### 3. FÁRMACOS MULTIDIANA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

#### 3.1. Observaciones generales

El tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas es una de las aplicaciones potenciales más interesantes de la estrategia multidiana a causa de su etiología multifactorial, que implica mecanismos moleculares muy complejos. Tomemos como ejemplo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia y para la que no hay un tratamiento efectivo pese a los enormes esfuerzos realizados hasta la fecha en la investigación en este campo. La gran complejidad de los mecanismos patológicos implicados explica por qué los tratamientos actuales, dirigidos a una única diana, no son capaces de alterar el curso de la enfermedad (7,8). Por este motivo, el interés en el empleo de fármacos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es cada vez mayor y algunos de ellos han alcanzado ya ensayos clínicos (9).

#### 3.2. El carácter multifactorial de las enfermedades neurodegenerativas

Como ejemplo representativo de la complejidad de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, se resumen en la figura 4 algunas de las dianas terapéuticas potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo:

1. Los procesos de formación de agregados de proteínas, incluyendo los ovillos tau y las placas beta-amiloides ( $A\beta$ ).
2. Los mecanismos de toxicidad sináptica.
3. Los daños asociados al estrés oxidativo y la neuroinflamación.

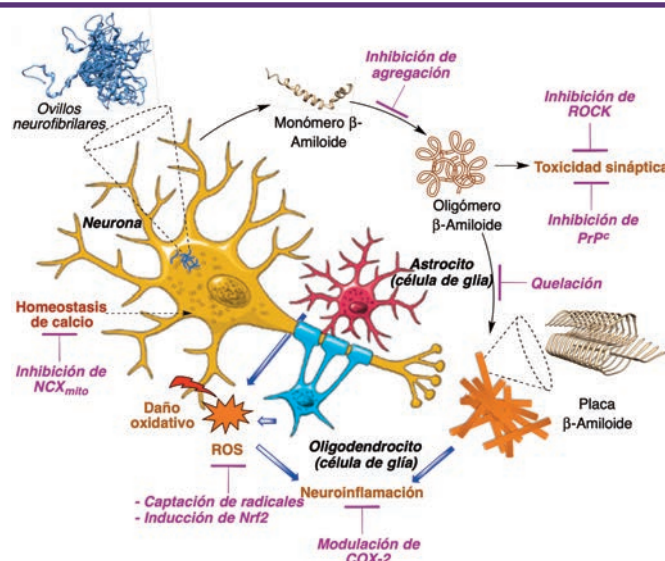


Figura 4. Algunas dianas terapéuticas relevantes en la enfermedad de Alzheimer

- Los procesos de control de la homeostasis del calcio, tanto intraneuronal como intramitocondrial.

Aunque no todas están estudiadas con el mismo nivel de detalle que la enfermedad de Alzheimer, puede afirmarse que las otras enfermedades neurodegenerativas presentan una complejidad etiológica comparable.

### 3.3. La vía Nrf2-ARE como una diana en enfermedades neurodegenerativas

Los antioxidantes pueden actuar por reacción directa con los radicales oxigenados o nitrogenados (captadores de radicales, *radical scavengers*), pero hay otra posibilidad, que implica la inducción de la vía transcripcional Nrf2-ARE. Esta vía se considera el principal mecanismo de regulación de la respuesta antioxidante a través de la estimulación de la síntesis de enzimas antioxidantes de fase II (10). Nrf2 tiene varios mecanismos de regulación, de los cuales el más conocido es la proteína Keap1, que actúa como su regulador negativo. Keap1 es capaz de secuestrar Nrf2 en el citoplasma, actuando como una ligasa E3 que promueve la ubiquitinación de Nrf2 y por tanto su posterior degradación por el proteosoma. Una forma de lograr la activación de Nrf2 es reducir su afinidad por Keap1, lo cual se puede conseguir por dos mecanismos principales:

- Keap1 contiene una región, compuesta por varios residuos de cisteína, que actúa como sensor de estrés oxidativo o de compuestos potencialmente tóxicos a causa de su electrofilia. Estas cisteínas están normalmente unidas a cationes zinc y se modifican, bien por oxidación a cistina en presencia de especies oxidantes, o bien por alquilación en presencia de electrófilos, lo que produce un cambio conformacional en Keap1 que afecta a la parte de la proteína que se une a Nrf2 y reduce la

afinidad de ambas proteínas. Por tanto, puede plantearse lograr la inducción de Nrf2 mediante el empleo de fármacos que contengan un fragmento electrófilo que active este mecanismo de control.

- Alternativamente, puede lograrse el mismo resultado por interferencia directa en la interacción entre Nrf2 y Keap1 (figura 5).

Esta disminución de la afinidad entre ambas proteínas implica la posibilidad de que Nrf2 pueda translocarse hasta el núcleo celular donde, previa interacción con ciertas proteínas que actúan como coactivadores, es capaz de reconocer un segmento específico del ADN conocido como elemento de respuesta antioxidante (ARE, *antioxidant response element*) o elemento de respuesta a electrófilos (ERE, *electrophile response element*). Como consecuencia, se induce la expresión de una serie de genes implicados en la respuesta antioxidante a través de la biosíntesis de numerosas proteínas citoprotectoras a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios, entre otros (figura 6). Existen mecanismos alternativos de activación de Nrf2, tales como la vía no canónica (11) y mecanismos indirectos basados en la modulación de ciertos receptores de membrana ( $\alpha_7$  nicotínico, melatonina) y la inhibición de la quinasa GSK3 $\beta$ , entre otros.

En resumen, la vía Nrf2-ARE es una diana muy prometedora en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, aunque está todavía relativamente poco explorada (12).

Sobre estas bases, resumiré a continuación algunos ejemplos de fármacos multidiana orientados al tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas, representativos de algunos aspectos de la investigación llevada a cabo recientemente en el grupo BIOHET de la Universidad Complutense.

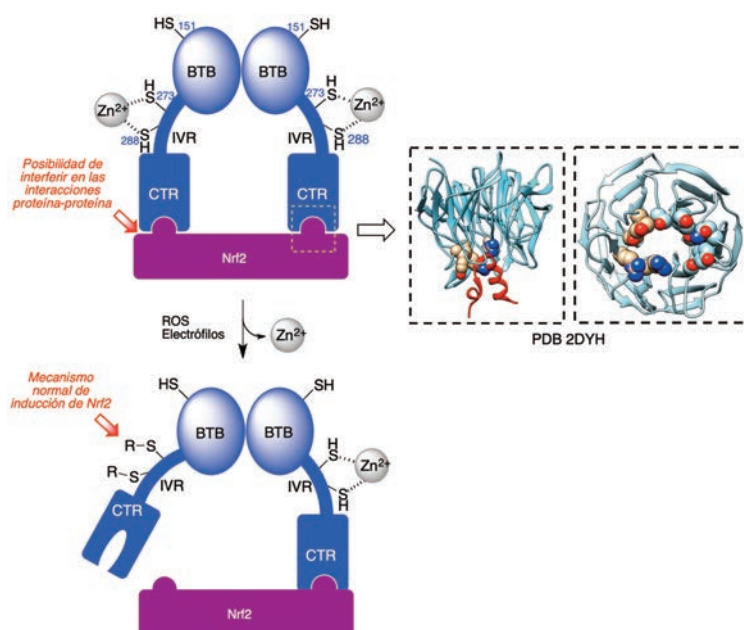


Figura 5. Regulación de Nrf2 por Keap1



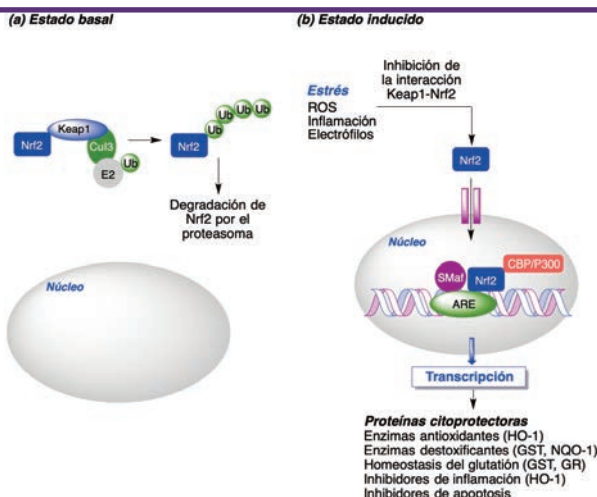


Figura 6. La vía Nrf2-ARE y su regulación por Keap1

#### 4. COMPUESTOS MULTIDIANA BASADOS EN LA MODULACIÓN DEL CALCIO INTRANEURONAL

Una disregulación de la homeostasis del calcio, asociada a una disfunción mitocondrial, tienen un papel clave en los mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades neurodegenerativas (13). Por tanto, compuestos capaces de mantener los niveles de calcio dentro de valores fisiológicos deberían ser efectivos como agentes neuroprotectores.

El control de los niveles de calcio intraneuronales se logra mediante la actuación de una amplia serie de proteínas de transporte cuyo conjunto se ha descrito como *calcium signaling toolkit* (14,15). Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en esta regulación, y nosotros fijamos nuestra atención en la inhibición de una proteína conocida como intercambiador mitocondrial sodio/calcio ( $NCX_{mito}$ ). Aunque esta proteína no se ha estudiado mucho como diana terapéutica, se sabe que su inhibición conduce a efectos neuroprotectores gracias a que se evita el paso de calcio de la mitocondria de las neuronas hacia el citosol, reduciendo por tanto los niveles de calcio en éste. Se conocen pocos inhibidores de

$NCX_{mito}$ , principalmente la benzotiazepina CGP-37157 y algunos análogos (16), y se sabe que estos compuestos son neuroprotectores en algunos modelos celulares. Su mecanismo de acción involucra probablemente a otros transportadores de calcio adicionales, como los canales neuronales dependientes de voltaje (17) y el canal conocido como SERCA (*Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) (18).

En relación con esta diana, hemos planteado la síntesis y estudio de compuestos multidiana basados en la estructura **1**, un isómero de CGP-37157 que tiene una actividad similar frente a  $NCX_{mito}$  y es más adecuado como punto de partida para la obtención de compuestos multidiana ya que la presencia del segundo átomo de nitrógeno permite la fácil incorporación de cadenas espaciadoras (figura 7A). En este contexto, nuestro proyecto implicaba la conexión mediante espaciadores adecuados del aza-análogo de CGP-37157 con otros compuestos de interés como neuroprotectores. Con esta finalidad, seleccionamos compuestos antioxidantes, como el ácido lipoico, y dihidropiridinas, a causa de su capacidad de inhibir canales de calcio, con el objeto de controlar los niveles de este catión por un segundo mecanismo (figura 7).

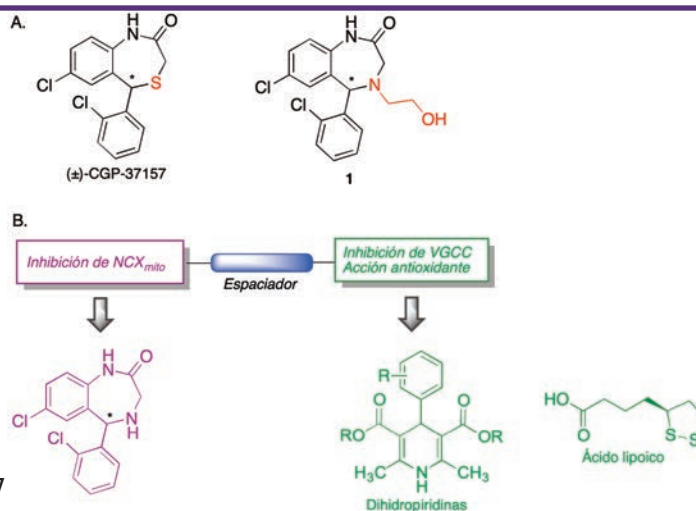


Figura 7. Estructuras híbridas diseñadas a partir de CGP-37157

Las dihidropiridinas tradicionales tienen algunos efectos cerebrales beneficiosos, incluyendo la prevención de la pérdida de memoria en ancianos. De hecho, una de ellas, el nilvadipino, ha alcanzado la fase III de ensayos clínicos contra la enfermedad de Alzheimer. El mecanismo de este efecto protector es poco claro, aunque se sabe que estos fármacos son antioxidantes. En nuestro caso, el estudio de las estructuras híbridas derivadas de dihidropiridina se inició con la construcción de una estructura híbrida aza-CGP-37157/nimodipino, para la que se esperaba de entrada el perfil farmacológico multidiana resumido en la figura 8.

La síntesis del sistema conjugado se resume en la figura 9, y se basa en la construcción inicial del compuesto **1**, seguida de su unión al acetilacetato de etilo por transesterificación para dar **2** y una reacción de Hantzsh final entre **2**, el compuesto **3**, obtenido por condensación de Knoevenagel del 3-nitrobenzaldehído y el acetilacetato de isopropilo, y amoníaco. El compuesto **4** así obtenido es una mezcla de diastereómeros, pero se consideró adecuado para un estudio inicial de prueba de concepto.

El estudio farmacológico del compuesto **4**, llevado a cabo en colaboración con varios grupos del Instituto Rafael Hernando de la Universidad Autónoma de Madrid, en especial el del Dr. Rafael León, se centró en su investigación en situaciones de isquemia, que no es en sí una enfermedad neurodegenerativa pero tiene como consecuencia procesos de neurotoxicidad aguda. Este estudio confirmó el perfil multidiana de **4**, que mostró las siguientes propiedades:

1. Neuroprotección en dos modelos celulares de sobrecarga de calcio: toxicidad inducida por altas concentraciones de

$K^+$  en células de neuroblastoma SH-SY5Y y por veratridina en rodajas de hipocampo.

2. Neuroprotección en un modelo celular de estrés oxidativo, como es el tratamiento con rotenona-oligomicina en células de neuroblastoma SH-SY5Y.
3. Se investigó el mecanismo del efecto antioxidante de **4**, encontrándose actividad captadora de especies reactivas de nitrógeno y una capacidad moderada de inducción de la vía Nrf2-ARE.
4. Propiedades antiinflamatorias, demostradas por la reducción de la producción de nitritos inducida por lipopolisacárido en cultivos de células de glía.
5. Efectos protectores en dos modelos agudos de isquemia cerebral en células de hipocampo: Excitotoxicidad inducida por glutamato y privación de oxígeno y glucosa.

Se pudo concluir, por tanto, que la estrategia de hibridación molecular había conducido a un compuesto con propiedades mejoradas respecto a las moléculas de partida, CGP37157 y nimodipino (19). No obstante, un problema no resuelto en el uso de dihidropiridinas como agentes de neuroprotección es el de disociar estos efectos (asociados al canal VGCC  $Ca_v1.3$ ) de los cardiovasculares (asociados al canal VGCC  $Ca_v1.2$ ). Nos planteamos, por tanto, diseñar compuestos que no cumplieran la relación estructura-actividad propia de las dihidropiridinas con actividad cardiovascular, bien conocida por la amplia investigación llevada a cabo a lo largo de los años sobre dihidropiridinas vasodilatadoras. Sobre esta base, planteamos la síntesis de una serie de 4,6-diaril-1,4-dihidropiridinas no sustituidas en C-5, que pudo llevarse a cabo por medio de una reacción multicomponente

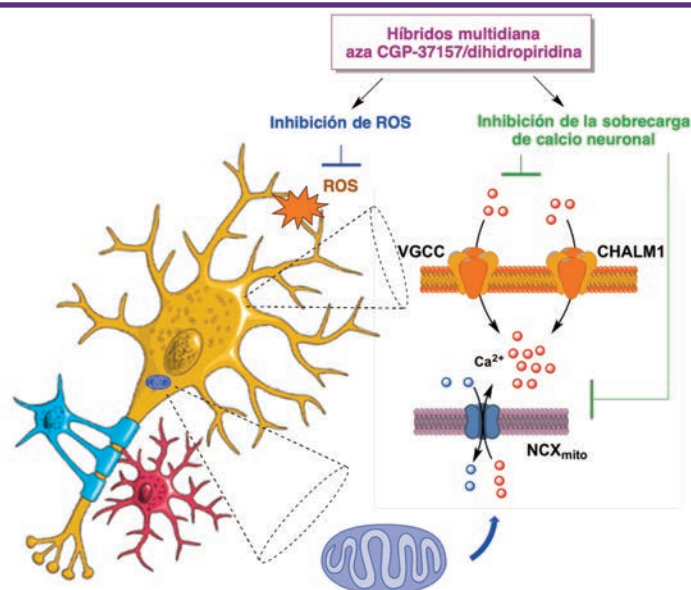
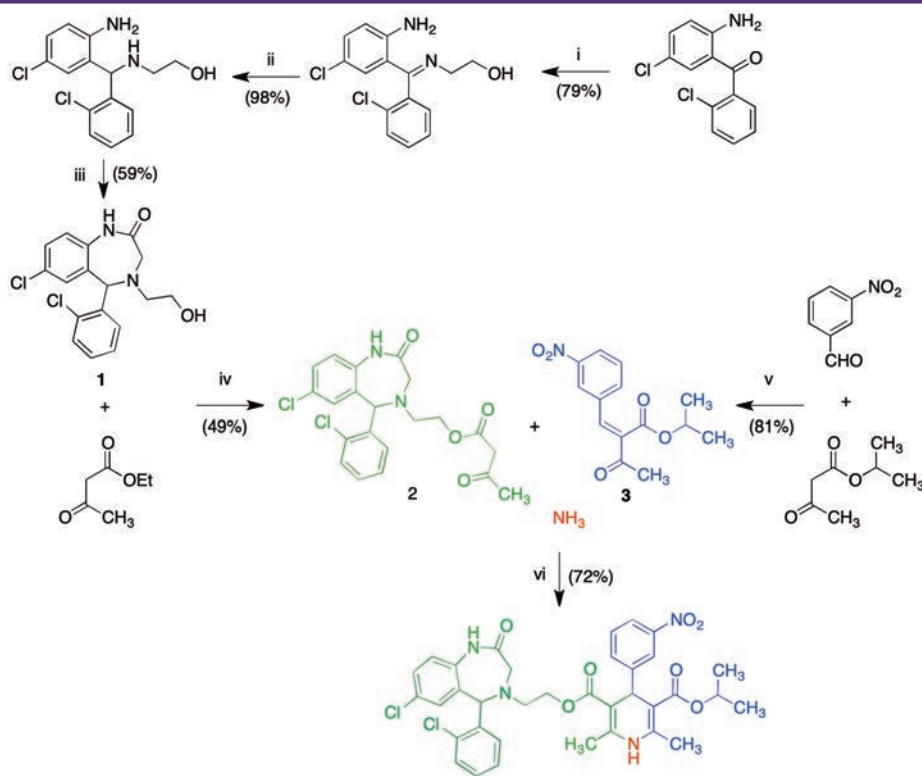


Figura 8. Perfil multidiana esperado para los compuestos conjugados aza CGP-37157/nimodipino



Híbrido aza CGP-37157 / nimodipino (4)

Figura 9. Síntesis del compuesto conjugado 4. Reactivos y condiciones: i. 2-Aminoetanol (sin disolvente), 140 °C, 20 h; ii.  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{MeOH}/\text{AcOH}$ , 0 °C a temperatura ambiente, 18 h; iii. (a) bromuro de bromoacetilo, 0 °C a temperatura ambiente, 17 h; (b) DIEA, 50 °C, 5 h; iv.  $\text{KOH}$  acuoso 2 M,  $\text{MeOH}$ , temperatura ambiente, 2 h. iv. Amberlist-15, tolueno, reflujo, 15 h. (v) Piperidina,  $\text{AcOH}$ , benceno, reflujo, 16 h; (vi)  $\text{EtOH}$ , reflujo, 15 h.

entre chalconas, compuestos  $\beta$ -dicarbonílicos y amoníaco (20). El estudio farmacológico de esta quimioteca demostró unas propiedades de neuroprotección similares a las encontradas previamente en el conjugado de nifedipino, además de una buena selectividad entre los canales VGCC  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v1.2$  (figura 10) (21,22). La conjugación de estas estructuras al fragmento de aza-CGP37157 está todavía pendiente.

Una complicación adicional de los sistemas conjugados derivados de aza-CGP37157 es la presencia de estereocentros en ambos farmacóforos, que hace que existan cuatro estereoisómeros de cada compuesto, con actividades potencialmente diferentes. Para un análisis detallado de la influencia de este factor en la actividad de nuestros fármacos multidiana, se hizo necesaria la obtención de ambos enantiómeros del esqueleto de aza CGP-37157. Tras varias rutas fallidas, se desarrolló una basada en el empleo como auxiliar quiral de la sulfonamida de Ellman, que puede considerarse un equivalente quiral al amoníaco. La reducción de la imina 5 así obtenida con hidruro de litio y tri-*tert*-butoxialuminio fue completamente diastereoselectiva, pasando por un estado de transición hexagonal con los grupos más voluminosos en disposición ecuatorial, y proporcionó el compuesto 6, cuya hidrólisis ácida condujo a la amina 7 en forma enantiomé-

ricamente pura. Su transformación en el enantiómero (*S*) del compuesto 1 se consiguió mediante tratamiento sucesivo con óxido de etileno y bromuro de bromoacetilo, seguido de hidrólisis básica. En este caso nos planteamos la obtención de conjugados con el ácido lipoico, ya que está disponible comercialmente en forma de sus dos enantiómeros. Así, la esterificación de (*S*)-1 con ácido (*S*)-lipoico proporcionó el compuesto conjugado 8a (Figura 11).

Aplicando un método similar, se logró la síntesis de los cuatro estereoisómeros de la estructura 8, como se indica en la figura 12.

El estudio farmacológico de los compuestos 8 reveló actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como capacidad de inducir Nrf2, junto con propiedades neuroprotectoras en modelos celulares de estrés oxidativo (rotenona-oligomicina) y de hiperfosforilación (ácido okadaico). Resultó interesante comprobar que la inducción de Nrf2 era altamente estereoespecífica en cuanto a la configuración de ambos estereocentros. El derivado de configuración *S,R* (8c) mostró la mejor actividad antiinflamatoria y neuroprotectora y será estudiado con más detalle en el futuro (23,24).



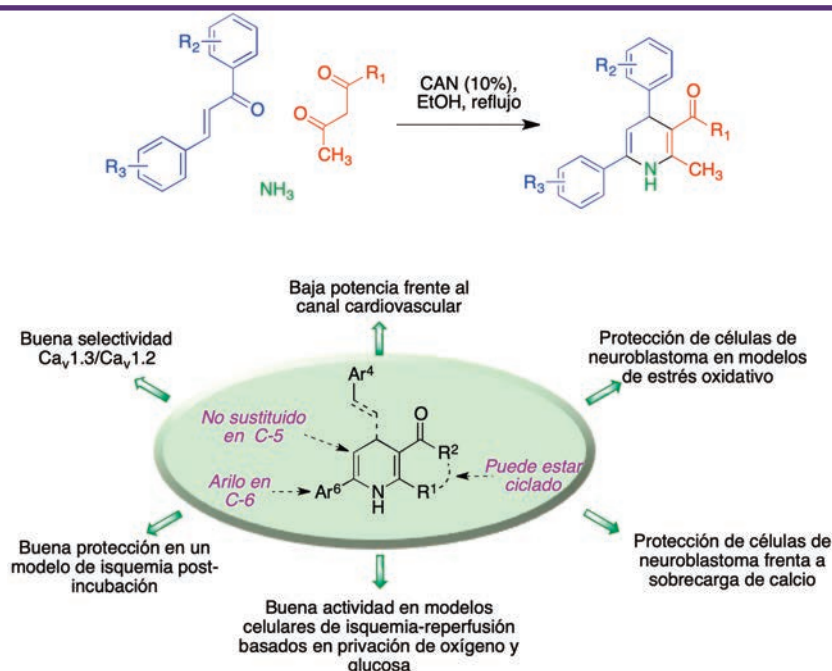


Figura 10. Síntesis de 4,6-diaryl-1,4-dihidropiridinas a través de una reacción multicomponente y resumen de su perfil farmacológico.

## 5. COMPUESTOS MULTIDIANA BASADOS EN LA MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

En uno de los proyectos llevados a cabo en el grupo, se planteó la preparación de compuestos híbridos que combinaran las estructuras de dos productos naturales con propiedades neuroprotectoras, la curcumina y la piperlongumina. La curcumina es el componente mayoritario del rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa*) y tiene un amplio espectro de propiedades de interés potencial en la enfermedad de Alzheimer (25), tales como propiedades antioxidantes

y antiinflamatorias (26), asociadas a la inducción de Nrf2 (27), y la capacidad de inhibir la agregación de proteínas amiloides [28] y la formación de ovillos tau (29). Sin embargo, la curcumina presenta una baja estabilidad química y metabólica que limita su utilización en terapéutica. Por ello, nos planteamos la preparación de análogos de curcumina de estabilidad mejorada por incorporación de un fragmento heterocíclico, que seleccionamos para que mostrara analogía con la piperlongumina, un alcaloide de *Piper longum* que inhibe el estrés oxidativo y la neuroinflamación, esta última por modulación de NF- $\kappa$ B (30) (figura 13).

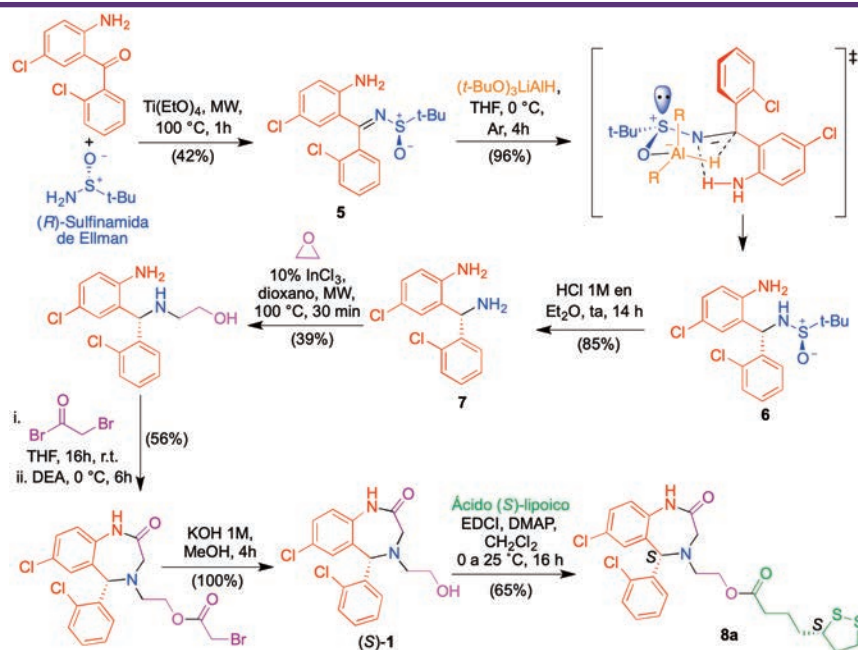


Figura 11. Síntesis enantioselectiva de un conjugado aza-CGP 37157/ ácido lipoico

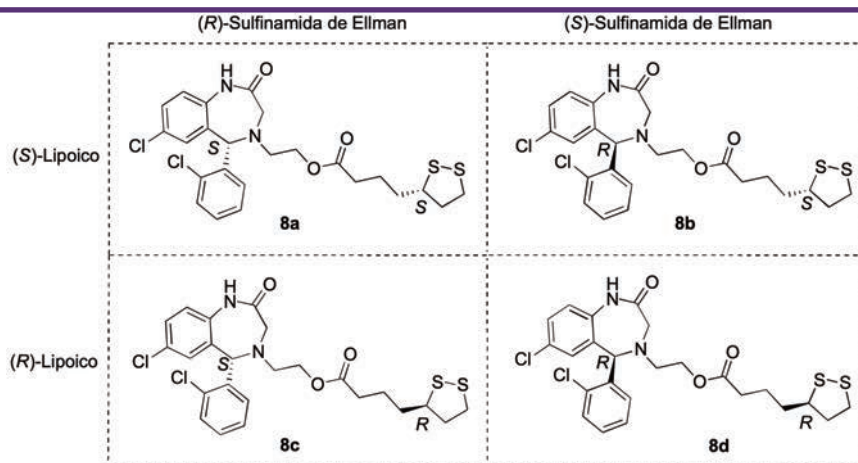


Figura 12. Los cuatro estereoisómeros de la estructura 8

La síntesis de los compuestos híbridos se basó en una reacción multicomponente previamente descrita por el grupo (31), en la que la irradiación con microondas focalizadas de  $\alpha$ -halocetonas, aminas primarias y compuestos  $\beta$ -dicarbonílicos en presencia de tricloruro de indio permite la síntesis de derivados de 2-pirrolin-5-ona 9. Su acilación con derivados del cloruro de cinamoilo en medio fuertemente básico proporcionó los compuestos híbridos deseados 10 (figura 14A). Estos compuestos mostraron un perfil multidiana muy prometedor, que se resume en la figura 14B e incluye propiedades antioxidantes por captación de radicales e inducción de Nrf2, actividad antiinflamatoria frente a lipopolisacárido, neuroprotección en modelos de estrés oxidativo e hiperfosforilación, así como la capacidad de inhibir la agregación de un hexapéptido (PHF6) representativo de la proteína tau (32).

Los compuestos 9 se utilizaron también como punto de partida para la obtención de una quimioteca de análogos de las bisavenantramidas, otra familia de productos naturales, que mostraron buenas propiedades antioxidantes y neuroprotección frente al estrés oxidativo (33).

## 6. COMPUESTOS MULTIDIANA BASADOS EN LA MODULACIÓN DE RHO QUINASA

Las proteínas Rho son proteínas de señalización englobadas en la superfamilia Ras y regulan muchos aspectos de la dinámica de la actina. Sus efectores son las rho-quinasa (ROCK). Estas enzimas modulan la actividad de la microglía y actúan como mediadores de la respuesta inflamatoria (liberación de citoquinas) y de la producción de ROS. En humanos, la forma predominante en el cerebro es ROCK2. El fasudil es un inhibidor de rho quinasa, aprobado en China y Japón para el tratamiento de vasoespismo cerebral e isquemia, que ha ensayado en fase II y también investigado para uso compasivo contra la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (34). Además, la vía rhoA/ROCK es importante para el control de la plasticidad sináptica, lo que la convierte en una diana terapéutica muy interesante en el control de la disfunción sináptica, un fenómeno común a múltiples enfermedades neurodegenerativas (35).

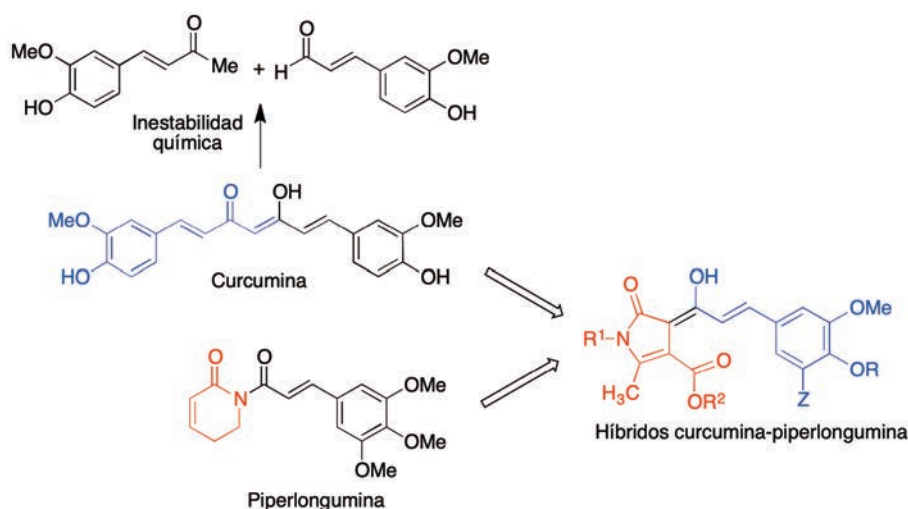


Figura 13. Diseño de los compuestos híbridos curcumina-piperlongumina

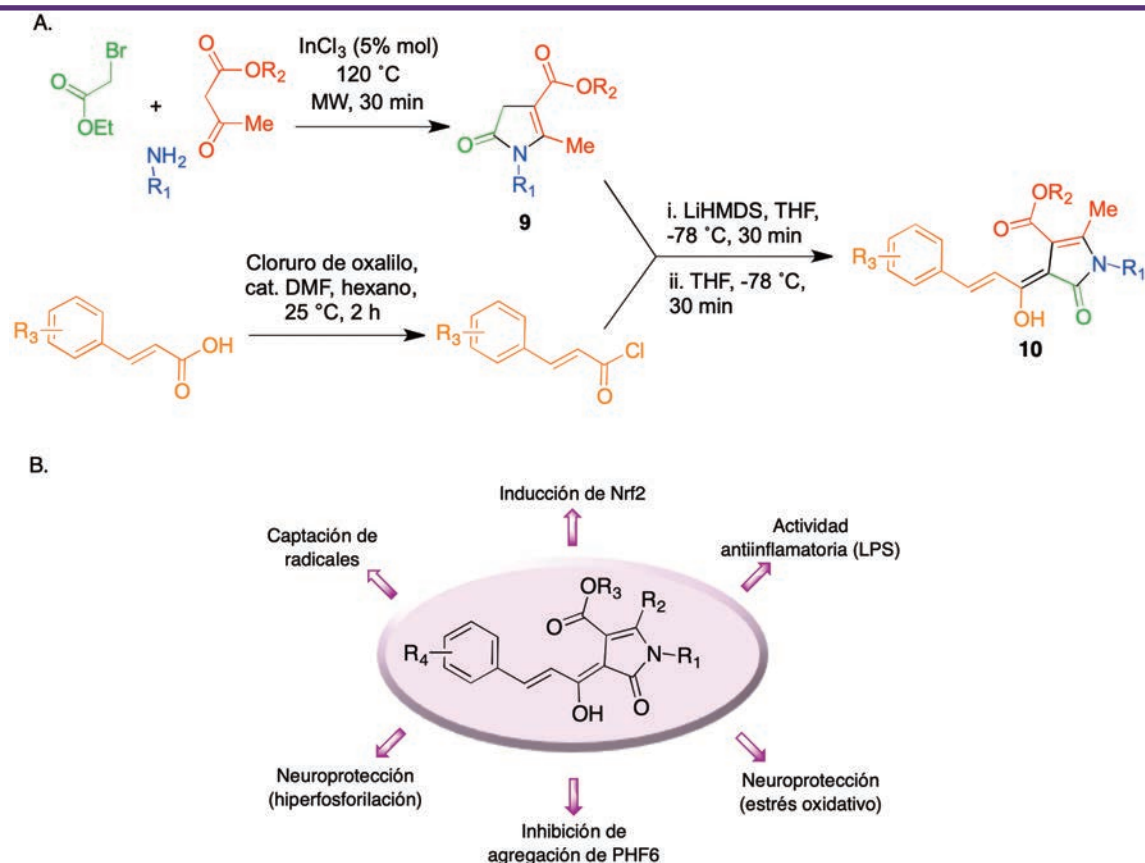


Figura 14. Síntesis y perfil farmacológico de los híbridos curcumina-piperlongumina

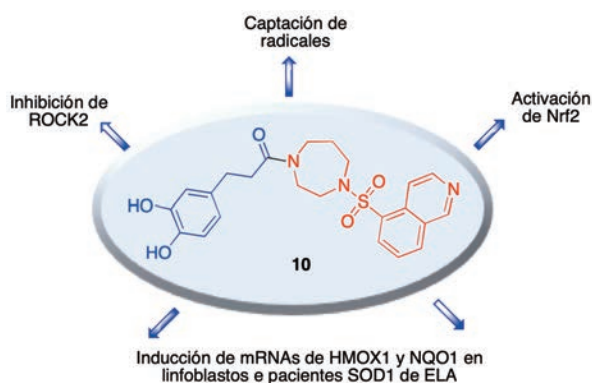


Figura 15. Perfil multidiana de un compuesto fusionado fasudil/ácido dihidrocafeico

En este contexto, y como parte de un proyecto dedicado a la investigación de nuevos fármacos multidiana en la esclerosis lateral amiotrófica, investigamos una quimioteca de estructuras fusionadas que combinan el fasudil con la compuestos relacionados con inductores naturales de Nrf2, como los ácidos ferúlico y cafeico. Uno de estos compuestos, de estructura **10**, mostró el perfil resumido en la figura 15, estudiado en colaboración con la Dra. Isabel Lastres-Becker, del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma, que incluye tanto la capacidad de inhibir ROCK2 como la de inducir Nrf2. Este compuesto fue también activo en linfoblastos de pacientes de ELA portadores de la mutación SOD-1 (36).

## 7. CONCLUSIONES

Las enfermedades neurodegenerativas son el principal desafío relativo a la salud que tienen que afrontar las sociedades desarrolladas en el futuro próximo. Estas enfermedades son uno de los campos más difíciles del descubrimiento de fármacos, lo que se atribuye a su naturaleza compleja y multifactorial, que hace difícil tratarlas con los fármacos convencionales, dirigidos a una sola diana. Los ligandos dirigidos a múltiples dianas pueden definirse como compuestos diseñados para que modulen al menos dos dianas diferentes y representan un nuevo paradigma en el descubrimiento



de fármacos que es especialmente prometedor en el caso de las enfermedades con mecanismos patológicos complejos y multifuncionales, como las enfermedades neurodegenerativas.

## Agradecimientos

El trabajo descrito en esta breve revisión no habría sido posible sin la ayuda de los colaboradores citados como coautores en la lista de referencias, junto con la de otros cuyo trabajo no he podido resumir aquí por limitaciones de espacio. A todos ellos, mi más profundo agradecimiento.

## 8. REFERENCIAS

1. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med*. 2018; 7: 3.
2. Hwang SH, Weckslar AT, Wagner K, Hammock BD. Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. *Curr Med Chem*. 2013, 20: 1783–1799
3. Korcsmáros T, Szalay MS, Böde C, Kovács IA, Csermely P. How to design multi-target drugs: Target search options in cellular networks. *Expert Opin Drug Discov*. 2007, 2:1-10.
4. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015, 14: 388.
5. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010, 6: 193.
6. Sweeney P, Park H, Baumann M, Dunlop J, Frydman J, Kopito R, McCampbell A, Leblanc G, Venkateswaran A, Nurmi A, Hodgson R. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl Neurodegener* 2017, 6: 6.
7. Vaz M, Silvestre S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *Eur J Pharmacol*. 2020, 887: 173554.
8. Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP. Update on Alzheimer's disease therapy and prevention strategies *Annu Rev Med*. 2017, 68: 413-430.
9. Bachurin SO, Bovina EV, Ustyugov AA. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: The major trends. *Med Res Rev*. 2017, 37: 1186-1225.
10. Buendía I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 2016, 157, 84.
11. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res*. 2018, 134: 92-99.
12. Cores A, Piquero M, Villacampa M, León R, Menéndez JC. NRF2 regulation processes as a source of potential drug targets against neurodegenerative diseases. *Biomolecules* 2020, 10:904.
13. Wang Y, Shi Y, Wei H. J. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: A target for new drug development. *Alzheimers Dis Parkinsonism* 2017, 7, 374.
14. Brini, M.; Calì, T.; Ottolini, D.; Carafoli, E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci*. 2014, 71: 2787-2814.
15. Dubois C, Prevarskaya N, Vanden Abeele F. The calcium-signaling toolkit: Updates needed. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1863(6 Pt B):1337-43.
16. González-Lafuente L, Egea J, León R, Martínez-Sanz FJ, Monjas L, Pérez C, Merino C, García de Diego AM, Rodríguez-Franco MI, García AG, Villarroya M, López MG, de los Ríos C. Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry. *ACS Chem Neurosci*. 2012, 3: 519.
17. Ruiz, A.; Alberdi, E.; Matute, C. CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Death Dis*. 2014, 5: 1156.
18. Loulousis MM, Darcy YL, Copello JA. Modulation by CGP-37157 (CGP) analogs of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA). *Biophys J*. 2016, 110: 598a.
19. Buendía I, Tenti G, Michalska P, Méndez-López I, Luengo E, Satriani M, Padín-Nogueira F, López MG, Ramos MT, García AG, Menéndez JC, León R. *ACS Chem Neurosci*. 2017, 8: 67–81
20. Tenti G, Ramos MT, Menéndez JC. One-pot access to a library of structurally diverse nicotinamide derivatives via a three-component formal aza [3+3] cycloaddition. *ACS Comb Sci*. 2012, 14: 551–557.
21. Tenti G, León R, Egea J, Villarroya M, Fernández JC, Padín JF, Sridharan V, Ramos MT, Menéndez JC. Identification of 4,6-diaryl-1,4-dihydropyridines as a new class of neuroprotective agents. *MedChemCommun* 2013, 4: 590-594.
22. Tenti G, Parada E, León R, Egea J, Martínez-Revelles S, Briones AM, Sridharan V, López MG, Ramos MT, Menéndez JC. New 5-unsubstituted dihydropyridines with improved CaV1.3 selectivity as potential neuroprotective agents against ischemic injury. *J Med Chem*. 2014, 57: 4313-4323.
23. Michalska P, Tenti G, Satriani M, Cores A, Ramos MT, García AG, Menéndez JC, León R. Aza-CGP37157-lipoic hybrids designed as novel Nrf2-inducers and anti-oxidants exert neuroprotection against oxidative stress and show neuroinflammation inhibitory properties. *Drug Devel. Res*. 2020, 81: 283-294.
24. Cores A, Michalska P, Pérez JM, Crisman E, Gómez C, Villacampa M, Menéndez JC, León R. Enantioselective synthesis and pharmacological evaluation of aza-CGP37157-lipoic acid hybrids for the





- treatment of Alzheimer's disease. *Antioxidants* 2022, 11: 112.
25. Farooqui AA, Therapeutic potentials of curcumin for Alzheimer's disease. Springer, Cham (Suiza), 2016.
  26. Peng Y, Ao M, Dong B, Jiang Y, Yu L, Chen Z, Hu C, Xu R. Anti-inflammatory effects of curcumin in inflammatory diseases: Status, limitations and countermeasures. *Drug Des Devel Ther* 2021, 15: 4503–4525.
  27. Shin JW, Chun, K.; Kim, D. H.; Kim, S. J.; Kim, S. H.; Cho, N. C.; Na, H. K.; Surh, Y. J. Curcumin induces stabilization of Nrf2 protein through Keap1 cysteine modification. *Biochem. Pharmacol.* 2020, 173: 113820.
  28. Lee, W. H.; Loo, C. Y.; Bebawy, M.; Luk, F.; Mason, R. S.; Rohani-zadeh, R. Curcumin and its derivatives: Their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* 2013, 11, 338-378.
  29. Soeda, Y.; Takashima, A. New insights into drug discovery targeting Tau protein. *Front. Mol. Neurosci.* 2020, 13, 590896.
  30. Kim, N.; Do, J.; Jae-sung, B.; Jin, H. K.; Kim, J.-H.; Inn, K.-S.; Oh, M. S.; Lee, J. K. Piperlongumine inhibits neuroinflammation via regulating NF- $\kappa$ B signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells. *J. Pharmacol. Sci.* 2018, 137, 195-201.
  31. Cores A, Estévez V, Villacampa M, Menéndez JC. Three-component access to 2-pyrrolin-5-ones and their use in target-oriented and diversity-oriented synthesis. *RSC Advances* 2016, 6: 39433-39443.
  32. Cores A, Carmona-Zafra N, Martín-Cámara O, Sánchez JD, Duarte P, Villacampa M, Bermejo-Bescós P, Martín-Aragón S, León R, Menéndez JC. Curcumin-piperlongumine hybrids with a multitarget profile elicit neuroprotection in in vitro models of oxidative stress and hyperphosphorylation. *Antioxidants*, 2022, 11: 28.
  33. Cores A, Abril S, Michalska P, Duarte P, Olives AI, Martín MA, Villacampa M, León R, Menéndez JC. Bisavenanthramide analogues as Nrf2 inducers and neuroprotectors in in vitro models of oxidative stress and hyperphosphorylation. *Antioxidants* 2021, 10: 941.
  34. Koch JC, Kuttler J, Maass F, Lengenfeld T, Zielke E, Bahr M, Lingor P. Compassionate use of the ROCK inhibitor fasudil in three patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Neurol.* 2020, 11: 173.
  35. Martín-Cámara O, Cores A, López-Alvarado P, Menéndez JC. Emerging targets in drug discovery against neurodegenerative diseases: Control of synapsis dysfunction by the RhoA/ROCK pathway. *Eur J Med Chem* 2021, 225: 113742.
  36. Martín-Cámara O, Arribas-Blázquez M, Wells G, Morales M, Martín-Requero A, Porras G, Martínez A, Giorgi G, López-Alvarado P, Lastres-Becker I, Menéndez JC. Dual rho kinase inhibition/NRF2 signalling activation by fasudil derivatives as a new multitargeted approach to the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Chem* 2022, 65: 1867-1882.

Si desea citar nuestro artículo:

**Fármacos multidiana como una nueva estrategia contra las enfermedades neurodegenerativas**

José Carlos Menéndez Ramos

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 389-401

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.05>



# ABORDAJE GLOBAL DEL PACIENTE CARDIOVASCULAR DE ALTO RIESGO

## GLOBAL APPROACH TO HIGH-RISK CARDIOVASCULAR PATIENTS

Maeve Soto-Pérez<sup>2</sup>, Juan Antonio Requena-Ibáñez<sup>2</sup> y Juan José Badimon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>Atherothrombosis Research Unit, Mount Sinai Heart, Icahn School of Medicine at Mount Sina, New York City, New York.

corresponding author: juan.badimon@mssm.edu

### ARTÍCULO

#### RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares suponen la primera causa de muerte a nivel mundial. La hipertensión, la diabetes y dislipemia son factores de riesgo cardiovascular que modulan la génesis, progresión y severidad de la enfermedad arteriosclerótica. La coexistencia de estos factores de riesgo aumenta el riesgo cardiovascular del paciente.

Las Guías de prevención cardiovascular más recientes recomiendan un control estricto y temprano del colesterol LDL. Hoy en día tenemos disponibles varios fármacos capaces de conseguir estos objetivos de una manera efectiva y segura. Estos incluirían desde las estatinas hasta anticuerpos monoclonales (inhibidores de la PCSK9), así como los recientemente desarrollados, el ácido bempedoico o el inclisiran.

El papel de los triglicéridos y HDL en la enfermedad cardiovascular ha generado controversia a lo largo de los años, habiendo sido relacionadas con los eventos isquémicos.

El control de la hipertensión arterial resulta fundamental en una sociedad con una esperanza de vida creciente, ya que se ha relacionado de forma independiente con un mayor riesgo de accidentes cerebrovasculares, el deterioro cognitivo y el desarrollo de demencia.

La diabetes mellitus está relacionada directamente con el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares y cerebrovasculares. Los agonistas de GLP-1 han sido relacionados con la reducción de ictus y los nuevos inhibidores de SGLT2 han revolucionado el tratamiento de la insuficiencia cardíaca tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos.

El control efectivo y temprano de estos factores de riesgo resulta fundamental para prevenir la enfermedad cardiovascular y disminuir el impacto socioeconómico de esta enfermedad en nuestra sociedad.

#### ABSTRACT

*Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. Hypertension, diabetes and dyslipemia are major cardiovascular risk factors, thus modulating genesis, progression, and severity of atherosclerosis. Coexistence of those risk factors further increase the cardiovascular risk of the patients.*

*Most recently published guidelines on cardiovascular disease prevention recommend a strict and fast LDL cholesterol control. Nowadays, an increasing number of drugs are available for achieving the rigorous objective in a safe and effective way.*

*These include multiple drugs from statins to monoclonal antibodies (as PCSK9 inhibitors) and also, the recently developed bempedoic acid and inclisiran.*

*Triglycerides and HDL cholesterol have been a controversial topic in cardiology, eventually been related with ischemic events.*

*In a society with an increasing life expectancy, the control of hypertension is mandatory as it has been independently related with an increased risk of cerebrovascular accidents, cognitive impairment, and the development of dementia. Diabetes mellitus is directly related with cardiovascular and cerebrovascular events. The use of GLP-1 agonists have decreased the risk of stroke and the new SGLT2 inhibitors transformed the heart failure treatment in diabetic and non-diabetic patients.*

*An effective and fast control of these risk factors is necessary to prevent cardiovascular diseases and decrease the socioeconomic impact of them in our society.*

#### Palabras Clave:

enfermedad cardiovascular  
factores de riesgo  
lípidos  
hipertensión  
Diabetes mellitus

#### Keywords:

cardiovascular diseases  
risk factors  
lipids  
hypertension  
Diabetes mellitus

## 1. INTRODUCCIÓN

En este artículo revisaremos los conceptos más importantes que nos ha dejado el pasado 2021. Entre ellos tenemos que destacar los siguientes:

1.- El incremento de la incidencia de los factores de riesgo cardiovasculares y su impacto socio-económico debido al aumento de eventos cardiovasculares en nuestra sociedad.

2.- La importancia y necesidad de implementar las medidas preventivas ya a un nivel primordial, sin esperar a la manifestación sintomatológica de la enfermedad cardiovascular.

3.- El posible nacimiento de una nueva disciplina, la **cardio-diabetología**, a consecuencia de los beneficios cardiorrenales asociados con el uso de los inhibidores del receptor SGLT2.

## 2. ETIOPATOLOGÍA MULTIFACTORIAL DE LA ARTERIOSCLEROSIS

La génesis y velocidad de progresión de la enfermedad arteriosclerótica está modulada por el número y la severidad de todos los factores de riesgo cardiovasculares coexistentes en el paciente(1). Los factores de riesgo que más frecuentemente coexisten en los pacientes cardíacos están representados en la Figura 1. En rojo están los factores que no se pueden modificar (sexo, edad y genética). Todos los demás se pueden modificar bien sea con estilo de vida o intervenciones farmacológicas.

Un malentendido muy generalizado es el concepto de que la aterosclerosis es una enfermedad que predominantemente afecta a los países con una renta per cápita más elevada debido a una

ingesta excesiva de calorías frente a los países con una renta más baja. La incoherencia de este concepto se ha puesto de manifiesto entre otros estudios, por el original PURE trial (2) y que ha sido corroborado, específicamente en Sudamérica en un reciente sub-estudio del PURE. (3) Lo que sí que es muy diferente es la mortalidad por causas cardiovasculares, esta es mucho más elevada en los pacientes con una renta per cápita más baja frente a la mortalidad de los países más desarrollados a consecuencia de un mayor uso de las medidas preventivas y/o terapéuticas.

Estas evidencias apoyan totalmente la importancia socio-económica de una implementación temprana de las medidas preventivas; medidas que no tiene que ser necesariamente farmacológicas, sino que podrían ser la consecuencia de un estilo de vida saludable. Estilo de vida que estaría caracterizado por una dieta más equilibrada, mayor actividad física y el abandono del hábito tabáquico.

## 3. DEFINICIÓN DEL PACIENTE CARDIOVASCULAR DE ALTO RIESGO

Normalmente existen un número elevado de criterios que nos permiten calcular el riesgo CV de un paciente (Framingham, ESC, ACC/AHA, etc). Pero siguiendo con el objetivo práctico y más didáctico de este evento, definiremos al paciente de alto riesgo como aquel que tiene enfermedad cardíaca establecida (CHD /ACS), es dislipémico, diabético e hipertenso. Características que son bastante frecuentes en los pacientes cardíacos. Figura 2.

La presencia de la enfermedad CV ya establecida está asociada con un riesgo elevado de sufrir eventos recurrentes. Los niveles

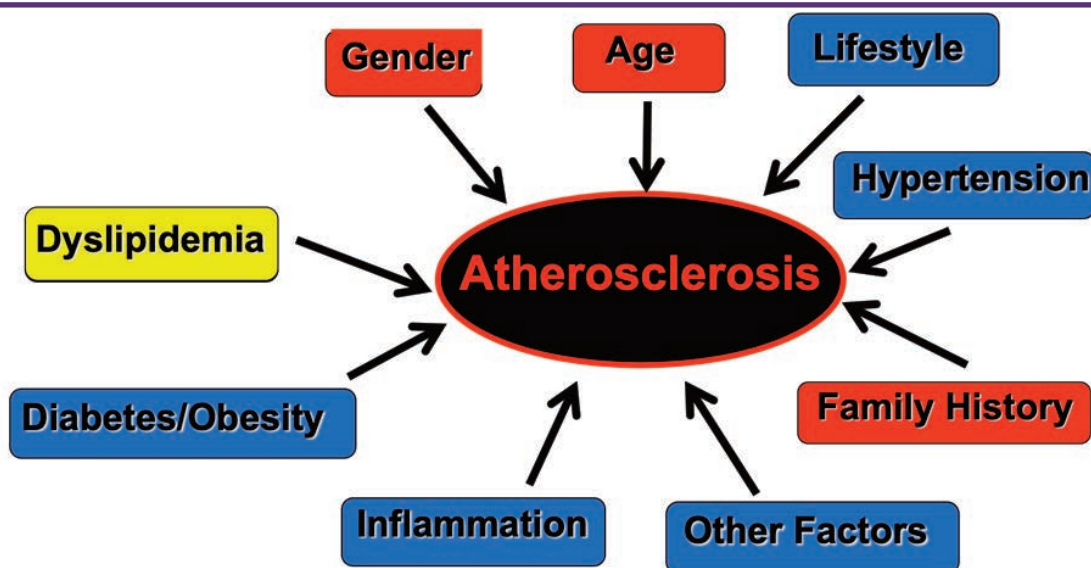


Figura1. Hipótesis multifactorial de la enfermedad arteriosclerótica



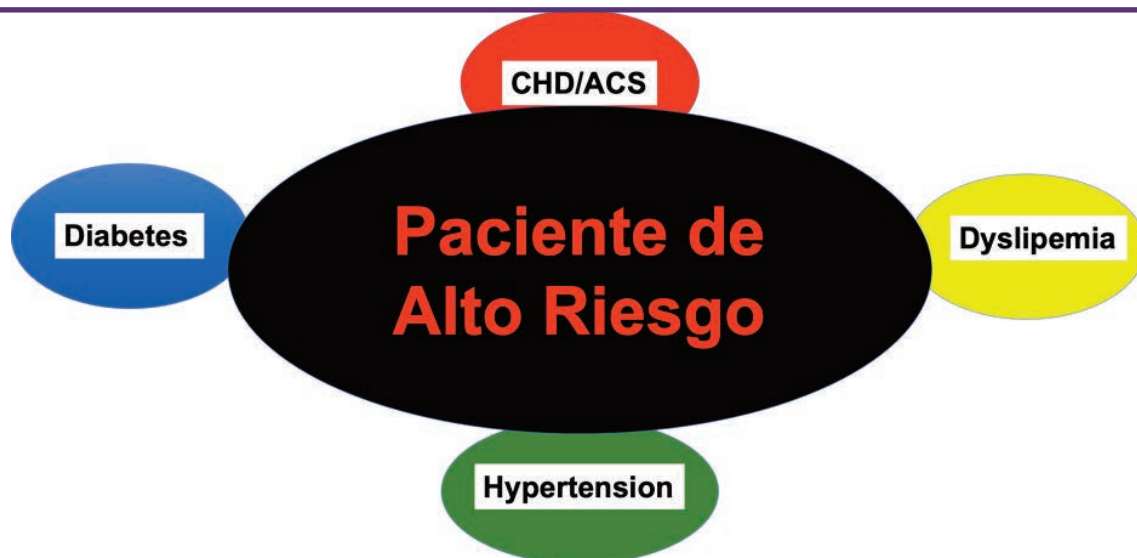


Figura 2. Definición de nuestro paciente de alto riesgo cardiovascular

de *lípidos elevados* están asociados con una progresión acelerada de la arteriosclerosis sin olvidar que favorece la formación de un status pro-inflamatorio y pro-trombótico. La *Diabetes mellitus* (T2DM) incrementa de 2-3 veces el riesgo de sufrir un evento agudo cardiovascular, así como la mortalidad asociada con estos eventos. La *hipertensión* incrementa el riesgo de embolias y del daño renal entre los pacientes. Una vez hemos definido nuestro paciente CV de alto riesgo, revisaremos las posibilidades terapéuticas para contrarrestar el riesgo de estos pacientes.

## 4. LÍPIDOS

Cuando hablamos de los lípidos sistémicos debemos de diferenciar entre el colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos.

### 4.1.- Colesterol-LDL

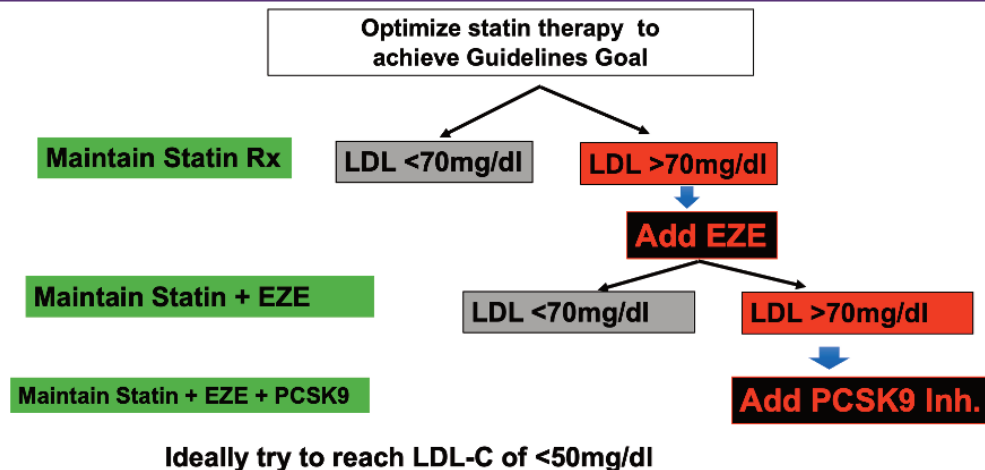
La causalidad entre los niveles elevados de LDL circulantes y el riesgo CV está claramente demostrado por un gran número de evidencias que incluyen estudios prospectivos, estudios de intervención e incluso estudios de randomización mendeliana. (4) En general, podemos decir que existe una correlación directa entre los niveles de LDL y el riesgo CV. Estas evidencias nos llevaron a buscar fármacos capaces de controlar mejor estos niveles elevados de LDL. La disponibilidad de estas estrategias cada vez más potentes ha ido cambiando históricamente los niveles de LDL recomendados por las Guías Internacionales. A través de los datos generados por los estudios con estatinas, ezetimibe, inhibidores de la proteína PCSK9 (PCSK9-i) bien como monoterapia o combinados, se ha generado el dogma de *"the lower the better"* (*cuanto más bajo mejor*). Este dogma está claramente apoyado por los datos de los estudios con PCSK9-I que han demostrado que unos niveles de LDL tan bajos

como 10mg/dl no son nocivos como se había llegado a pensar en un pasado. Se había postulado la existencia de una curva en forma de "U" diciendo que tanto los niveles muy elevados como los muy bajos de colesterol incrementaban el riesgo de cáncer de colon. Por ello, además de apoyar el dogma *"the lower the better"* yo incluso añadiría *"if earlier even better"* (y cuanto antes aún mejor).

Entonces, ¿cuáles son las recomendaciones de las Guías internacionales más recientes en relación con los niveles de LDL en pacientes de alto riesgo CV? La Figura 3 presenta un algoritmo. En estos pacientes la primera opción es el uso de las estatinas dada la seguridad y eficacia de esta clase de fármacos para controlar los niveles elevados de LDL. Por ello, deberíamos de optimizar la intensidad de la estatina escogida para poder llegar a unos niveles de LDL <55mg/dl.

Cuando hablamos de la terapia con estatinas, me gustaría recalcar algunos puntos de la mayor importancia. El primero es que, una vez iniciado el tratamiento con estatinas, a menos de que el paciente manifieste efectos adversos a estas, hay que mantenerlo de por vida. Y cuando digo de por vida, quiero decir que los ancianos también se benefician de las estatinas. (5)

¿Qué podemos decir sobre los posibles efectos adversos asociados con las estatinas? Mucho se ha hablado sobre ellos, llegando a postular que hasta un 25% de pacientes pueden no responder a este tratamiento. Un reciente meta-análisis con más de 4 millones de pacientes ha concluido que si reducimos todos los otros factores que pueden estar de alguna manera relacionados con la manifestación de los supuestos efectos adversos, llega a la conclusión, que únicamente un 9% de pacientes podrían realmente tener efectos adversos a las estatinas (6). De interés, en ese mismo análisis mencionaba a la raza hispana como uno de los posibles factores protectores frente a los efectos adversos.



**Figura 3.- Algoritmo para el tratamiento de pacientes en prevención secundaria**

Figura 3. Algoritmo para el tratamiento de paciente en prevención secundaria

#### 4.2. Ezetimibe

En caso de que no consiguiésemos llegar a estos niveles deberíamos de añadir ezetimibe. El ezetimibe inhibe la absorción intestinal del colesterol de la dieta. La administración conjunta de estatina + ezetimibe aumenta significativamente la actividad hipolipemiente al tener un efecto dual. La inhibición de la síntesis de colesterol de novo por la estatina, combinado con una menor absorción del colesterol exógeno mediada por el zetimibe, resulta en una mayor actividad hipolipemiente al atacar las dos fuentes, endógena y exógena, del colesterol sistémico. La eficacia de esta intervención fue inicialmente demostrada en el estudio IMPROVE-IT con simvastatina + Ezetimibe (7). Hoy en día, tenemos la posibilidad de combinar estatinas más potentes que la simvastatina, tales como la atorvastatina y/o rosuvastatina con ezetimibe para conseguir una mayor reducción de las LDL.

#### 4.3.. Acido Bempedoico

Es una alternativa a las estatinas para controlar los niveles de LDL. Una de las novedades es que afecta la síntesis endógena de colesterol aun nivel más elevado que las estatinas. Inhibe la enzima adenosina trifosfato-citrato liasa (ACL), enzima que únicamente se expresa en el hígado y por tanto no tendría ningún efecto sobre las mialgias asociadas con el uso de las estatinas. Su efectividad a nivel sistémico ha sido demostrada en los estudios CLEAR (8). Dado estos resultados, ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de adultos -con hipercolesterolemia familiar heterocigótica o con enfermedad CV establecida; bien sea solo o combinado con ezetimibe, es importante tener en cuenta que- aún no tenemos resultados de estudios de eventos cardiovasculares.

#### 4.4. Inhibidores de la Proteína PCSK9

Estos agentes son anticuerpos monoclonales que inhiben la interacción de la PCSK9 con el receptor hepático de las LDL. En condiciones normales el receptor hepático de las LDL reconoce las LDL y la PCSK9 que son internalizadas vía endocitosis y los lisosomas metabolizan las LDL y el receptor. La presencia del anticuerpo evita la internalización de la PCSK9 permitiendo la interacción con las LDL. Estas son metabolizadas y el receptor reciclado con lo que podrá servir de transporte hepático de más partículas de LDL con el consiguiente aumento de la actividad hipolipemiente.

Alirocumab y Evolocumab son los dos anticuerpos aprobados por la FDA. De una manera muy breve podríamos decir que estos agentes son capaces de reducir en un 50-60% los niveles de LDL tanto en pacientes en estatinas, pacientes intolerantes a las estatinas e incluso en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica. La eficacia de estos agentes ha sido recientemente revisada (9). Un punto importante a tener en cuenta es que estos agentes, además de su marcado efecto sobre las LDL, también son capaces de bajar los triglicéridos e incluso los niveles de Lp(a) (10). Entre sus inconvenientes tenemos que mencionar su administración parenteral entre 2-4 veces por mes y su elevado precio.

#### 4.5. Inclisiran

Este agente es el primero generado por las nueva tecnología de los RNA silenciadores. El RNA silenciador que penetra en el complejo RISC del hígado y al hibridarse con el RNA mensajero de la proteína PCSK9 inhibe su síntesis. Este mecanismo tiene la ventaja de que sólo necesita de una administración cada 6 meses y es capaz de reducir hasta en un 60% los niveles de LDL elevados (11). Entre los inconvenientes de este agente, que ya está aprobado por la FDA, además de su administración parenteral, también hemos de mencionar su elevado coste.



## 5. COLESTEROL-HDL Y TRIGLICERIDOS

Durante mucho tiempo hemos estado hablando del papel protector de las HDL frente a la enfermedad CV. Estos beneficios estaban apoyados por una serie de evidencias epidemiológicas, dietéticas e incluso por estudios de intervención farmacológica (niacina) en la era pre-estatinas. Estudios posteriores con fibratos no han corroborado estos beneficios inicialmente postulados. Además, estudios de randomización mendeliana no apoyan la hipótesis protectora de las HDL.

La T2DM está asociada con un incremento de eventos CV. El perfil lipídico de los pacientes diabéticos cursa con unos niveles elevados LDL y triglicéridos (TGLs) y bajos de HDL. Se ha visto que, especialmente en los diabéticos, existe una relación inversa entre los niveles de HDL y de triglicéridos. ¿Será que durante todos estos años nos hemos estado fijando en el parámetro equivocado y en vez de las HDL bajas nos deberíamos de fijar en los TGLs elevados?

Alrededor de los 60's, el Dr. Zilversmith mencionó que una gran parte del día la pasamos en condiciones de hiperlipidemia postprandial y, por tanto, con niveles elevados de TGLs. Varios meta-análisis han postulado una asociación entre TGLs y eventos CV; asociación que es independiente de los otros factores de riesgo CV como las LDL por ejemplo (12).

Los fibratos son capaces de bajar entre 10-20% los niveles elevados de TGLs, cuando se usan en una población adecuada; es decir que tenga unos niveles elevados (aproximadamente >175 - 200mg/dl de TGLs). Un problema que afecta al uso de los fibratos es la generalización de la interacción que existe entre el Gemfibrozilo y las estatinas se aplique a los fibratos actuales. Interacción que si existe, pero que se puede disminuir en gran manera si damos la estatina por la noche y el fibrato por la mañana.

Otra terapia común para combatir los niveles elevados de TGLs es el uso de concentrados de ácidos grasos polinsaturados (W-3 FAs). En relación con la eficacia de los W-3 FAs, tenemos un meta-análisis que claramente demuestra la poca efectividad de estos suplementos (13), sin embargo, este concepto de la no eficacia de los W-3 se ha puesto en duda después de la publicación del reciente estudio REDUCE-IT (14). Este estudio demostró una reducción de 20% de los TGLs y una reducción del 25% del objetivo primario tras la administración de 4grs/día del ácido etil eicosapentanoico. La marcada reducción de eventos no se podía explicar totalmente en base al efecto hipotriglicerimiente.

Para complicar el horizonte, el estudio STRENGTH (15) publicó resultados negativos al igual que los estudios VITAL (16), ASCEND (17) y OMEMI (18).

Un análisis más detallado de los resultados positivos del REDUCE-IT con los negativos de los otros estudios ha generado la pregunta de si el Icosapent ethyl es únicamente otro W-3 o si tiene

alguna otra actividad. Dos son las explicaciones posibles a la discrepancia tan marcada de estos estudios. La primera es la dosis y contenido del ácido etil eicosapentanoico que representa (4gr) frente a los otros W-3 que primordialmente contienen ácido eicosapentanoico a dosis mucho más bajas (19). La otra es mucho más compleja; Budoff et al. publicaron el estudio EVAPORATE (20). Este estudio tenía como objetivo el efecto de ácido etil eicosapentanoico en la composición de las placas ateroscleróticas durante el periodo de tratamiento. Los autores demostraron una reducción del 17% en el contenido graso de las placas en el grupo tratado frente a un exagerado incremento del 109% en el grupo control. Específicamente uso el término "control", en vez de placebo, porque este grupo recibió aceite mineral. Estos resultados generan la incógnita de si los resultados positivos se deben a los beneficios del tratamiento o a los efectos nocivos del aceite mineral. Es importante tener en cuenta que los otros estudios usaron aceite de maíz en el grupo control.

De todas maneras, para controlar los niveles elevados de TGLs, yo les recomendaría primero incrementar su ingesta de pescado, realizar más ejercicio y, si todavía quieren utilizar algún W-3 FA, recomendaría que usen el ácido etil eicosapentanoico, basado en las evidencias del REDUCE-IT.

## 6. PRESIÓN ARTERIAL

Numerosos estudios han demostrado que la presión arterial elevada es un factor de riesgo cardiovascular, habiéndose relacionado con la aterosclerosis, la enfermedad coronaria, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad arterial periférica, la insuficiencia renal y la fibrilación auricular (32). El riesgo de muerte por enfermedad coronaria o ictus se incrementan de forma lineal a partir de niveles de presión arterial sistólica (PAS) de 90mmHg y 75 mmHg de presión diastólica (PAD) (33, 34).

El beneficio absoluto de reducir la PAS depende de la reducción absoluta de la PAS que obtengamos y no tanto de los fármacos que utilicemos para conseguirlo, ya que en función de las cifras de las que se partan podría ser necesario uno o más grupos farmacológicos para conseguir una reducción significativa. Hay que tener en cuenta que esta reducción de la presión arterial está condicionada por la tolerabilidad del paciente y la seguridad (35).

Un estudio reciente llama la atención ya que ha relacionado, de forma independiente, el aumento de presión arterial a largo plazo con el deterioro cognitivo, el riesgo de desarrollo de demencia, y la mortalidad por cualquier causa en adultos cognitivamente sanos (21). Por todo ello, y ya que la esperanza de vida ha aumentado significativamente hoy en día, es de vital importancia realizar esfuerzos adicionales para mejorar el control de la presión arterial.



## 7. DIABETES MELLITUS/ SÍNDROME CARDIO-METABÓLICO

El síndrome cardio-metabólico se puede definir como una disfunción metabólica caracterizada por resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipemia mixta, hipertensión arterial, adiposidad central incrementada, entre otros. La T2DM está caracterizada por unos niveles elevados de glucosa y/o hemoglobina glicada y un elevado riesgo de eventos CVs. La T2DM está muy asociada a la obesidad y una vida sedentaria. Afecta a más de 29 millones de americanos y se estima que para el año 2050 1 de cada 3 americanos será diabético. La estimaciones entre los hispanos son similares por no decir que todavía más desoladoras.

La importancia clínica y social de la diabetes está manifestada por su presencia entre los pacientes cardíacos. El paciente cardíaco "*vulgaris*" suele presentar dislipemia, hipertensión y diabetes. Por ello el tratamiento óptimo debe incluir el estricto control de los lípidos, de la presión arterial y por supuesto controlar los niveles de Hb A1c.

Hoy en día disponemos de un gran número de fármacos capaces de controlar de una manera efectiva y mantenida los niveles elevados de glucosa y/o HbA1c. El problema es que controlando los niveles de glucosa, se reducen los eventos microvasculares; pero no somos tan efectivos reduciendo los eventos macrovasculares como los accidentes cerebrovasculares y los infartos.

¿Qué podemos hacer para reducir la tasa de eventos cardíacos entre los diabéticos? Los tratamientos más efectivos son los agonistas del receptor GLP-1 ("glutides") y los inhibidores del receptor SGLT2 ("gliflozinas").

### 7.1. Agonistas del receptor GLP-1 Receptor (GLP-1RA)

Los agonistas del receptor GLP-1 (GLP-1RA) son agentes miméticos de las incretinas y por ello desarrollan su actividad a nivel cerebral reduciendo el apetito, a nivel estomacal, al enlentecer el vaciado gástrico y prolongar la sensación de saciedad y, a nivel pancreático estimulando la secreción de insulina e inhibiendo la liberación de glucagón. Entre los GLP-1RA es importante tener en cuenta que a pesar de los meta-análisis que nos muestran un efecto beneficioso asociado a la clase de los GLP-1RA; la realidad es que no todos son iguales, y que los estudios LEADER con liraglutide, SUSTAIN-6 con semaglutide y HARMONY con albiglutide parecen indicar que estos agentes son los GLP-1RA con mayor efectividad para reducir infartos e ictus en pacientes cardiovasculares (22).

### 7.2. Inhibidores del Receptor SGLT2

Los receptores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2-i) son un nuevo grupo farmacológico. Estos fármacos que inicialmente fueron desarrollados como antidiabéticos, han transformado el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. El estudio EMPAREG-Outcome fue el primero que describió los beneficios car-

diacos en pacientes diabéticos (23). Posteriormente, estudios similares con otros SGLT2-i (canagliflozina, dapagliflozina y ertugliflozina) dieron resultados similares confirmando que estamos en presencia de un efecto de clase (24).

El hecho de que los SGLT2-i redujeran de una manera significativa la mortalidad CV sin reducir en gran manera los niveles de HbA1c (una media de 0.5-0.7%) ni la incidencia de los eventos aterotrombóticos (infartos y embolias), nos llevó a pensar en la existencia de un mecanismo de acción independiente de su actividad hipoglucémica. Otras observaciones que corroboraron esta hipótesis fue la rapidez con que se detectaban los beneficios en las primeras 3-4 semanas del tratamiento. Esto nos llevó a diseñar el estudio EMPATRO-PISM pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) pero sin diabetes (25, 26). Nuestro estudio demostró que los mismos beneficios también estaban presentes en pacientes no diabéticos y postulamos que un uso selectivo de cuerpos cetónicos como fuente de energía miocárdica, podría al menos parcialmente, explicar los beneficios observados. Los estudios clínicos EMPEROR-REDUCED y DAPA-HF confirmaron los beneficios en pacientes con IC tanto diabéticos como no-diabéticos (27).

Un análisis más detallado también demostró la existencia de unos efectos protectores a nivel renal (24). Los beneficios cardiorrenales asociados al tratamiento con SGLT2-i están claramente establecido por los estudios clínicos mencionados previamente. Lo que no está tan definido es el mecanismo(s) responsable de estos beneficios. Se han postulado un gran número de mecanismos (28). Pero nuestros estudios postulan un papel predominante de un uso selectivo de cuerpos cetónicos (29). De una forma más detallada, recientemente hemos realizado una revisión donde postulamos la existencia de un mecanismo pleiotrópico independiente de la actividad hipoglucémica este nuevo grupo farmacológico (30).

### ¿Cómo usar los SGLT2 en combinación con la terapia recomendada por las Guías?

Históricamente el tratamiento recomendado para los pacientes de IC con fracción de eyección reducida (HFrEF) recomendado por las Guías incluía la combinación de varios fármacos tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)/antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II), inhibidores de la neprilina (ARNI), antagonistas del receptor de la aldosterona (ARM) y betabloqueantes (BB). Un reciente meta-análisis ha demostrado que los beneficios de los SGLT2-i son aditivos a cualquiera de las posibles combinaciones de fármacos usados en el tratamiento de los pacientes con HFrEF (31).

Otro punto importantísimo desde el punto de vista terapéutico es, que debido a la rapidez con que se presentan los beneficios, se recomienda que en pacientes con HFrEF de nuevo diagnóstico, el uso de los SGLT2-i debe de implementarse lo antes posible en combinación con un BB. Posteriormente, deberíamos de añadir un ARM o ARNI, según la preferencia del médico. Lo ideal sería que consiguamos los 4 fármacos en un periodo de 4 semanas (Figura 4 ).



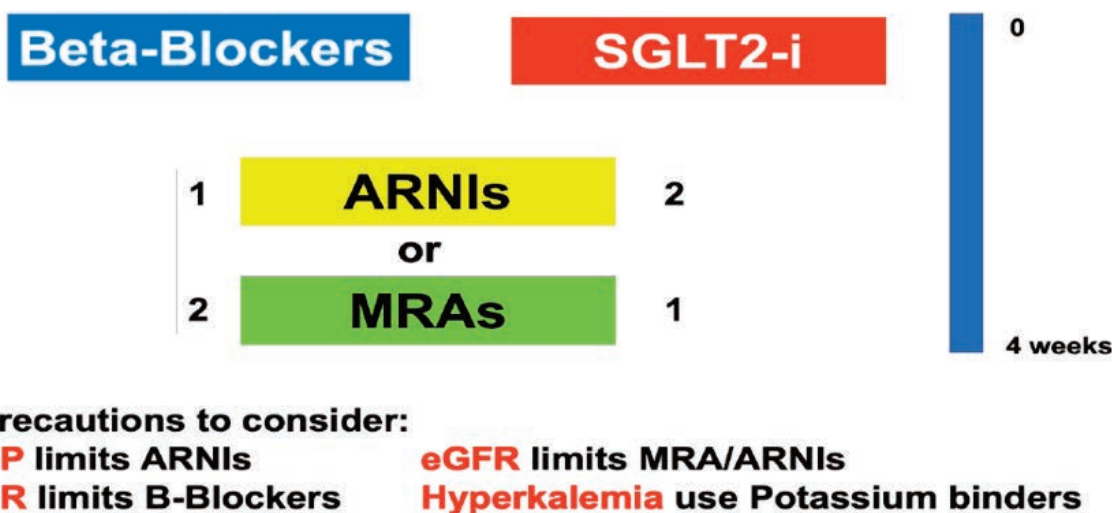


Figura 4. Protocolo de tratamiento para pacientes de IC

## 8. CONCLUSIONES

1.- A pesar de la seguridad y eficacia de las estatinas y otros fármacos hipolipemiantes, todavía exististe una cierta resistencia en implementar los objetivos de LDL recomendados por las Guías internacionales. Estos problemas son mucho más marcados cuando se aplican a pacientes de prevención secundaria.

2.- Es de la mayor importancia el tratar al paciente como un todo en vez de controlar los factores de riesgo de una manera aislada.

3.- Es mucho más fácil, barato y efectivo el prevenir que el curar. Por ello debemos de ser mas proactivos en términos de prevención.

## 9. REFERENCIAS

- Gaye B, Canonico M, Perier MC et al. Ideal Cardiovascular Health, Mortality, and Vascular Events in Elderly Subjects: The Three-City Study. *JACC* 2017;69 3015- 3026.
- Yusuf S, Rangarajan S, Teo K et al. Cardiovascular Risk and Events in 17 Low-, Middle-, and High-Income Countries. *NEJM* 2014; 371:818.
- Lopez-Jaramillo P, Philip Joseph P, Lopez-Lopez JP et al. Risk factors, cardiovascular disease, and mortality in South America: a PURE sub-study. *Eur Heart J.* ehac113, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac113>.
- Ference BA, Ginsberg H, Graham I et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017, 38, 2459–2472.
- Mortensen MB and Nordestgaard BG. Elevated LDL cholesterol and increased risk of myocardial infarction and atherosclerotic cardiovascular disease in individuals aged 70–100 years: a contemporary primary prevention cohort. *Lancet* 2020, 396:1644–1652.
- Bytyçi I, Penson PE, Mikhailidis DP et al. Prevalence of statin intolerance: a meta-analysis. *Eur Heart Journal*, 2022: 1–16. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac015>.
- Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP et al. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *NEJM* 2015; 372:2387.
- Tummala R, Gupta M, Reddy A et al. Bempedoic acid and its role in the management of hyperlipidemia in atherosclerosis. *Annals of Medicine* 2022 54:1287–1296.
- Katzmann JL, Gouni-Berthold I et al. PCSK9 Inhibition: Insights From Clinical Trials and Future Prospects. *Front. Physiol.* 2020 <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595819>.
- Ruscica M, Greco MF, Ferri N et al. Lipoprotein(a) and PCSK9 inhibition: clinical evidence. *Eur Heart J. Supplements*, 2020 Vol 22, Issue Supplement\_L, L53–L56, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suaa135>.
- Cordero A, Santos-Gallego C, Facila L et al. Estimation of the major cardiovascular events prevention with Inclisiran. *Atherosclerosis* 2020; 313:76.
- Holmes MV, Asselbergs FW, Palmer TM et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. *Eur Heart J.* 2015, 36:539.
- Aung T, Halsey J, Kromhout D et al. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA Cardiol* 2018 ;3:225–234. doi: 10.1001/jamacardio.2017.5205.



14. Bhatt D, Steg GP, Miller M et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *NEJM* 2019; 380:11.
15. Nissen SE, Lincoff AM, Wolski K, et al. Association Between Achieved  $\omega$ -3 Fatty Acid Levels and Major Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients With High Cardiovascular Risk: A Secondary Analysis of the STRENGTH Trial. *JAMA Cardiol* 2021;6:1-8.
16. Manson JE, Bassuk SS, Cook NR et al. Vitamin D, Marine n-3 Fatty Acids, and Primary Prevention of Cardiovascular Disease Current Evidence. *Circ Res* 2020;126(1):112-128. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314541.
17. Bowman L, Mafham M, Wallendszus K et al. Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus. *NEJM* 2018; 379:1540.
18. Kalstad AA, Myhre PL, Laake K et al. Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Elderly Patients After Myocardial Infarction: A Randomized, Controlled Trial. *Circulation* 2021;143:528-539. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052209.
19. Martson NA, Giugliano R, Im KA et al. Association Between Triglyceride Lowering and Reduction of Cardiovascular Risk Across Multiple Lipid-Lowering Therapeutic Classes: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis of Randomized Controlled Trials. *Circulation* 2019;140:1308-1317.
20. Budoff MJ, Bhatt DL, Kunninger A et al. Effect of icosapent ethyl on progression of coronary atherosclerosis in patients with elevated triglycerides on statin therapy: final results of the EVAPORATE trial. *Eur Heart J*. 2020 Oct 21;41(40):3925-3932. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa652.
21. Li C, Zhu Y, Ma Y et al. Association of Cumulative Blood Pressure With Cognitive Decline, Dementia, and Mortality. *J Am Coll Cardiol* 2022;79:1321-1335. doi: 10.1016/j.jacc.2022.01.045.
22. Marsico F, Paolillo S, Gargiulo P, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on major cardiovascular events in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without established cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J*. 2020;41:3346-3358. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa082.
23. Zinman N, Fitchett D, Bluhmki E et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015;373:2117-28.
24. McGuire DK, Shih WJ, Cosentino F, et al. Association of SGLT2 Inhibitors With Cardiovascular and Kidney Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *JAMA Cardiol* 2021;6:148-54. doi: 10.1001/jamacardio.2020.4511.
25. Santos-Gallego C, Vargas-Delgado AP, Requena-Ibanez JA et al. Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(3):243-255. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.008.
26. Requena-Ibáñez JA, Santos-Gallego CG, Rodríguez-Cordero A, et al. Mechanistic Insights of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With HFrEF: From the EMPA-TROPISM Study. *JACC Heart Fail*. 2021;9:578-589. doi: 10.1016/j.jchf.2021.04.014.
27. Zannad F, Ferreira JP, Pocock SJ, et al. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials. *Lancet* 2020;396:819-829. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31824-9.
28. Lopaschuk GD, Verma S. Mechanisms of Cardiovascular Benefits of Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: A State-of-the-Art Review. *JACC Basic Transl Sci* 2020;5(6):632-644. doi: 10.1016/j.jacbts.2020.02.004.
29. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, et al. Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:1931-1944. doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.056.
30. Yurista S, Chong CR, Badimon J et al. Therapeutic Potential of Ketone Bodies for Patients with Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art-Review. *JACC* 2021;77:1660-69. Doi:10.1016/j.jacc.2020.12.065.
31. Tromp J, Ouwker W, van Veldhuisen DJ et al. A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Pharmacological Treatment of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* 2022;10:73-84. doi: 10.1016/j.jchf.2021.09.004.
32. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 2012;380(9859):2224-2260.
33. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;360(9349):1903-1913.
34. Whelton SP, McEvoy JW, Shaw L, Psaty BM, Lima JAC, Budoff M, et al. Association of Normal Systolic Blood Pressure Level With Cardiovascular Disease in the Absence of Risk Factors. *JAMA Cardiol* 2020;5(9):1011-1018.
35. Wills AK, Lawlor DA, Matthews FE, Sayer AA, Bakra E, Ben-Shlomo Y, et al. Life Course Trajectories of Systolic Blood Pressure Using Longitudinal Data from Eight UK Cohorts. *PLOS Medicine* 2011;8(6):e1000440.

Si desea citar nuestro artículo:

**Abordaje global del paciente cardiovascular de alto riesgo**

Maeve Soto-Perez, Juan Antonio Requena-Ibanez y Juan Jose Badimon

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 403-411

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.06>

## NEURAMINIDASA / SIALIDASA DEL VIRUS DE LA GRIPE: SUS CARACTERÍSTICAS, NOMENCLATURA, MEDIDA DE ACTIVIDAD, CINÉTICA, INHIBIDORES AGENTES TERAPÉUTICOS

### NEURAMINIDASE / SIALIDASE FROM INFLUENZA VIRUS: ITS CHARACTERISTICS, NOMENCLATURE, MEASURING OF ACTIVITY, KINETICS, INHIBITORS AS THERAPEUTIC AGENTS

**José Antonio Cabezas Fernández del Campo**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** jacabezasfde@movistar.es

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

Después de describir las características principales de la enzima neuraminidasa / sialidasa del virus de la gripe, se comenta lo relativo a su peculiar nomenclatura oficial; y se indican dos nuevos procedimientos (fluométrico y por luminiscencia) para determinar su actividad, empleados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca (Prof. J. A. Cabezas), de elevada sensibilidad y sencillez. Se describe la cinética de la sialidasa de tres cepas A y de tres cepas B de este virus, y el resultado de la comparación de las propiedades biológicas y físicas de cepas de virus de origen humano y animal (cerdo y pato) pertenecientes al mismo subtipo A(H1N1). Finalmente, se analizan datos acerca de los inhibidores de esta enzima Zanamivir, Oseltamivir y Peramivir, usados como agentes terapéuticos frente a la gripe, así como las ventajas y limitaciones de su empleo.

#### ABSTRACT

*The main characteristics of neuraminidase / sialidase from Influenza Virus and its peculiar nomenclature are described, as well as two new, sensitive and simple procedures (fluorometric and by luminiscence) for measuring neuraminidase activity, which have been used at the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the University of Salamanca (Prof. J. A. Cabezas). The kinetics of neuraminidase of three A and three B Influenza Virus Strains, and the result of the comparison of biological and physical properties of human and animal origin (pig and duck) Virus Strains, belonging to the same subtype A(H1N1), are described. Finally, the advantages and risks for the use as therapeutic agents against Influenza of the Influenza Virus neuraminidase inhibitors Zanamivir, Oseltamivir and Peramivir are discussed.*

#### Palabras Clave:

neuraminidasa / sialidasa  
virus gripe  
Inhibidores

#### Keywords:

neuraminidase / sialidase  
influenza virus  
inhibitors



## 1. INTRODUCCIÓN

Los virus de la gripe pertenecen a la familia de los ortomixovirus (*Orthomyxoviridae*); tienen la propiedad de unirse a las glicoproteínas de la membrana de las células. Examinados al microscopio electrónico presentan forma sensiblemente esférica, aunque a veces también muestren formas muy alargadas. Comprenden una envoltura provista de proyecciones (espículas) que son la **hemaglutinina** (abreviadamente HA o H) y la **neuraminidasa** (NA o N), denominada también **sialidasa**. Dicha envoltura consta de una bicapa lipídica, en la que se hallan introducidas parcialmente la HA y la NA. Debajo de la bicapa lipídica se encuentra la capa protídica, formada por la **proteína M**, que constituye la parte interna de la cubierta o envoltura vírica. El genoma consta de ocho segmentos de **ARN**, monocatenario, asociado a una proteína específica e inserto helicoidalmente en ella constituyendo la **nucleocápsida**.

Se consideran valores medios para los constituyentes víricos, los siguientes: 70-75 % de proteínas; 18-20 % de lípidos; 2-8 % de glúcidos y, aproximadamente, un 1 % de ARN. Se distinguen varios tipos de proteínas: unas tienen función estructural, como la proteína M (que forma la matriz de la estructura), y otras son de carácter enzimático, como las **polimerasas**. Los lípidos presentan cierta variabilidad; proceden de la membrana de la célula hospedadora, que así los pierde. Se trata mayoritariamente de **fosfolípidos**, que constituyen la bicapa lipídica del virus, protegiéndolo además de la acción de proteasas. También proteínas de la célula hospedadora pueden quedar “empaquetadas” en el interior de los viriones o permanecer fijadas en la superficie de éstos, como consecuencia de procesos de maduración por gemación.

La nucleocápsida (formada por las nucleoproteínas y el ARN) y la proteína M son antígenos internos que permiten distinguir **tres tipos para la gripe: A, B y C**. Los antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) o sialidasa definen los subtipos propios de tipo A. Este tipo es el más importante y generalmente peligroso desde el punto de vista epidemiológico, siguiéndole el B. Éste frecuentemente acompaña al A; en él no se han encontrado subtipos y su actividad sialidásica es menor que en el A. En cuanto al C, se ha observado que carece de esta actividad, poseyendo la de una **O-acetilesterasa**, que libera restos O-acetilo, preferentemente de la posición 9, terminal, de algunos ácidos siálicos.

El **ciclo biológico del virus** comienza con su fijación a la célula; sigue con la penetración en la misma, la liberación del ARN vírico dentro de la célula y, después, la utilización de mecanismos de la célula en beneficio de la multiplicación propia: transcripción del ARN vírico en ARN mensajero (ARNm), traducción del ARNm en proteínas víricas y biosíntesis de ARN complementario (ARNc) po-

sitivo, por replicación. El ARNc servirá para la biosíntesis de nuevas moléculas de ARN negativo que formarán parte de los futuros viriones.

Hay que añadir tres etapas más: las moléculas de HA y NA, formadas en el retículo endoplásmico y transportadas a través del aparato de Golgi, se fijan en la parte externa de la célula hospedadora; tiene lugar el ensamblaje o acoplamiento, cerca de esa zona, de todos los componentes víricos, de modo que las nucleoproteínas envuelven helicoidalmente a los ARN negativos para formar la nucleocápsida. Todo ello queda rodeado por la proteína M; y se incorporan a su alrededor los lípidos de la membrana de la célula hospedadora. Provisto de esa envoltura, el virión recién formado, momentáneamente retenido sobre la superficie exterior de la célula, se libera de ella por acción de la neuraminidasa o sialidasa, quedando la célula seriamente dañada.

Esta enzima pertenece a la clase de las hidrolasas. Libera restos de **ácidos siálicos**, unidos a otra molécula glucídica o no glucídica. Fue Hirst, en 1942, quien descubrió que los virus de la gripe ocasionaban la aglomeración de los hematíes (hemaglutinación). Este fenómeno desaparecía por la intervención de una “enzima destructora de los receptores” que existía en dichos virus. La demostración de que eran ácidos siálicos las moléculas liberadas se logró, hacia 1955, por E. Klenk y H. Faillard, en la Universidad alemana de Colonia, y por A. Gottschalk, en la australiana de Cambera. Tal hallazgo constituyó un hito en la historia de la Virología, que desde entonces no pudo seguir sosteniendo la idea de que la ausencia de enzimas era una característica de los virus. Por otro lado, la amplia distribución de esta enzima, hallada también en algunos paramixovirus (asociada a la hemaglutinina), en algunas bacterias y protozoos, y en numerosos órganos de mamíferos, hace que las investigaciones sobre ella sigan siendo de gran interés.

## 2. NOMENCLATURA DE LA NEURAMINIDASA O SIALIDASA

El empleo de ambos nombres es el reflejo de la controversia que existió inicialmente en la denominación de los ácidos hoy llamados siálicos, derivados del **ácido neuramínico**. E. Klenk, en Colonia, a partir de cerebros de ciertos pacientes fallecidos, identificó un nuevo compuesto, hacia 1935, al que denominó *Neuramin Säure* (ácido neuramínico), asignándole una estructura química que resultó ser inexacta. Independientemente, G. Blix y colaboradores, en Uppsala (Suecia), hacia 1936, aislaron, a partir de la mucina submaxilar bovina, una nueva sustancia, a la que asignaron una estructura que también resultó ser errónea. La denominaron *sialic acid*, por hallarse en la saliva (*sialon*, en griego). Hacia 1949, A. Gottschalk, en Cambera, sometió ciertas glicoproteínas a un tratamiento con virus de la gripe, obteniendo un producto (por acción





de la enzima entonces llamada RDE, que después fue identificada como neuraminidasa o sialidasa) que poseía propiedades similares a las de la sustancia obtenida por Blix y también con la aislada por Klenk.

Establecida la estructura correcta de dicha sustancia, principalmente por E. Klenk y H. Faillard, hacia 1954, se llegó a la conclusión de que se trataba de un nuevo compuesto, de cuya estructura derivaban otros, existentes en numerosos materiales biológicos a concentraciones relativamente elevadas.

Con objeto de disipar dudas y unificar criterios, Blix, Gottschalk y Klenk, en 1957, acordaron denominar a esa estructura fundamental *neuraminic acid*, y a los derivados de ella, frecuentemente acilados (acetilados, glicolilados, etc.), *sialic acids*.

Si en la primera Nomenclatura y clasificación de enzimas (*International Union of Biochemistry*, 1961) solamente se decía que la enzima *neuraminidase* (EC 3.2.1.18) "probablemente hidroliza uniones  $\alpha$ -2,6 entre el ácido *N*-acetilneuramínico y residuos de 2-acetilgalactosamina", esto mismo se repetía en las ediciones de 1964 y 1965. Pero, en la edición de 1972, se la denomina, además, *sialidase*; y se incluyen por primera vez tres referencias (que corresponden a publicaciones de Gottschalk de los años 1957-60).

En la edición de dicha Nomenclatura oficial del año 1984 se señala como "nombre recomendado" el de *sialidase*, modificando el orden anterior respecto a *neuraminidase*. Se respalda dicha enzima con seis referencias, siendo una de las cuales la publicación de nuestro laboratorio de la referencia 1 del presente artículo (1).

En la edición de 1992, manteniendo esas referencias y denominaciones, se le asigna el nombre de *exo- $\alpha$ -sialidase*; y se incluye por primera vez una *endo- $\alpha$ -sialidase* (1, 2).

Además, otra sialidasa, aunque con escasa o nula relación con los virus de la gripe, también ha sido incorporada oficialmente a este grupo. Es la *anhydrosialidase*.

Finalmente, en tripanosomas tiene particular importancia la *trans- $\alpha$ -sialidase* (3).

### 3. MÉTODOS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ESTA ENZIMA

La caracterización y "tipificación" de las cepas o estirpes de los virus de la gripe requieren ineludiblemente la valoración de su actividad sialidásica, además de otras determinaciones.

Las técnicas de valoración de esta enzima en diversos materiales biológicos, desde bacterias a mamíferos, pueden aplicarse, con algunas adaptaciones, a los virus de la gripe.

Sin embargo, un problema que en ellos se plantea es el de si es indispensable separar y purificar la enzima previamente a su valoración o si se podría medir la actividad en el virus directa-

mente. Se ha comprobado que ambas posibilidades pueden utilizarse, con tal de no inactivar o hacerle perder parte de su actividad en los procesos de separación (3, 4), en el primer caso; y de utilizar técnicas suficientemente adecuadas (específicas y sensibles) si se usan los virus enteros.

Sustratos naturales tales como la *N*-acetilneuraminil-lactosa, la fetuina, el orosomucoide, glicoproteínas de glándulas submaxilares y la glicoforina (4, 5) pueden emplearse con este fin. Otro grupo es el de los sustratos artificiales (6), entre los que se encuentran el *p*-nitrofenil-*N*-acetilneuramínico y el metilumbeliferil-*N*-acetilneuramínico.

Además, otro grupo de sustratos es el formado por derivados marcados con elementos radioisotópicos, frecuentemente con tritio; si bien su uso no es habitual.

Por último, otros dos procedimientos de valoración de esta actividad enzimática son, los más recientes, de tipo fluorométrico o por bioluminiscencia, descritos detalladamente en sendas publicaciones del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca (7, 8). Tienen la ventaja de ser de alta sensibilidad y sencillez de ejecución.

El fluorométrico (7) determina la cantidad de ácido *N*-acetilneuramínico enzimáticamente liberado a partir de la *N*-acetilneuraminil-lactosa. La lactosa resultante de la acción de la neuraminidasa es hidrolizada mediante galactosidasa, y la galactosa así formada es oxidada por una galactosa-deshidrogenasa y  $\text{NAD}^+$ . Finalmente, el NADH resultante es cuantificado por fluorometría (con excitación a 340 nm y análisis de la luz emitida a 465 nm). Mide concentraciones tan bajas de ácido siálico como 2 nmol.

En la valoración por bioluminiscencia (8) también el sustrato es la *N*-acetilneuraminil-lactosa, siguiéndose las mismas etapas que en el procedimiento precedente hasta llegar a la formación de NADH. La concentración de éste se determina ahora mediante un sistema luminiscente que acopla  $\text{NAD(P)H}$ -deshidrogenasa (FMN) y luciferasa. Este ultrasensible método determina concentraciones tan bajas como 5 pmol de ácido *N*-acetilneuramínico (equivalentes a 0,15 ng de ácido siálico liberado).

### 4. CARACTERIZACIÓN Y CINÉTICA DE LA NEURAMINIDASA DE VARIAS CEPAS DEL VIRUS DE LA GRIPE

Cepas corrientes H1N1, N2N2 y H3N2 del virus de la gripe tipo A fueron recogidas y purificadas para determinar su actividad sialidásica. Usando sustratos naturales y sintéticos se obtuvieron los resultados siguientes: El pH óptimo, la estabilidad térmica, la velocidad máxima de la reacción y la constante de Michaelis eran diferentes comparando unas cepas respecto a otras (9).

Estudios cinéticos sobre la sialidasa de tres cepas del virus de gripe tipo B y tres cepas del tipo A mostraron que la actividad y la



velocidad máxima fueron siempre más elevadas para las cepas tipo A respecto al B. Sin embargo, sus respectivos comportamientos respecto a dos inhibidores competitivos fueron similares (10). Este aspecto puede tener repercusión práctica en estudios de inhibidores como agentes terapéuticos (véase más adelante).

La comparación de algunas propiedades biológicas y físicas del mismo subtipo A (H1N1) de origen humano y animal (cerdo y pato) indicó que las cepas de procedencia aviar eran más resistentes que las de mamíferos a la alta temperatura y al pH bajo. Estas diferencias podrían atribuirse a una adaptación de los virus en las aves a la temperatura de éstas (40° C); y a que el virus es en las aves enterotrópico, pudiendo soportar condiciones de acidez diferentes a las que se dan en los mamíferos. No obstante, estos resultados no contradicen la hipótesis sobre una posible filiación entre ortomixovirus de aves y de mamíferos (11).

## 5. INHIBIDORES DE LA NEURAMINIDASA DESTINADOS A SER APLICADOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS FRENTE A LA GRIPE

Los compuestos químicos que inhiban adecuadamente —sin toxicidad y eficazmente— la neuraminidasa del virus de la gripe pueden ser potencialmente agentes de utilidad terapéutica, ya que se considera a esta enzima como factor que contribuye poderosamente a la propagación de dicha enfermedad. Es de advertir que esta utilización es compatible con el empleo de vacunas y sueros.

Desde 1960, ya se observó que el propio ácido *N*-acetilneuramínico se comporta como un agente inhibidor específico para el virus de la gripe tipo A.

Desde entonces, otros compuestos que poseen similitud estructural con este ácido siálico han sido ensayados con esta finalidad, observándose que actúan como inhibidores de tipo competidor de la actividad de dicha enzima. Así lo es el compuesto obtenido por síntesis denominado ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-trifluoracetilneuramínico (FANA) (12). A pesar de su potente efecto inhibidor, su toxicidad relegó su eventual aplicación terapéutica.

Para la finalidad terapéutica perseguida, la inhibición de la actividad neuraminidásica producida por el ácido *N*-acetilneuramínico resultaba de escaso interés, dado el carácter reversible del proceso, el rápido catabolismo de dicho producto, etc. Sin embargo, el estudio de la cinética de la reacción facilitó el conocimiento detallado de la formación de un compuesto correspondiente al estado de transición de la reacción que resultó ser muy útil.

Se obtuvieron resultados esperanzadores con análogos estructurales de dicho compuesto correspondiente al estado de transición de la reacción enzimática, que poseen un doble enlace en el anillo estructural (Neu5Ac2en), más abreviadamente conocido como DANA (13).

Partiendo de estos datos, se han podido diseñar racionalmente inhibidores para la neuraminidasa de los virus de la gripe. Uno de ellos es el **zanamivir** (ácido 4-guanidin-2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-acetilneuramínico); o abreviadamente, 4-guanidin-Neu5Ac2en.

En el **oseltamivir**, el anillo heterocíclico del zanamivir queda reemplazado por uno ciclohexénico, y el grupo carboxilo es reemplazado por su éster etílico. El carácter lipofílico de esta molécula garantiza el que pueda atravesar la barrera digestiva —circunstancia que no sucede con el zanamivir—, siendo un profármaco el que se convierte en forma activa por acción de las esterasas hepáticas (14).

Otro inhibidor, surgido posteriormente a los mencionados, es el **peramivir**. Comparte con el zanamivir la presencia en su molécula del grupo guanídico, y con el oseltamivir la cadena lateral lipófila, difiriendo de ambos por contener un ciclopentano en lugar de los anillos hexagonales de éstos.

¿Por qué el zanamivir y el oseltamivir son inhibidores tan eficaces de la sialidasa de los virus de la gripe tipo A (incluida la gripe aviar) y tipo B? Porque se unen al sitio activo de la enzima. La profunda cavidad de dicho sitio activo contiene aminoácidos que son una invariante en las sialidasas de todas las cepas de virus de la gripe A y B que han sido caracterizadas. Pero ello no significa que la unión se haga implicando los mismos aminoácidos del sitio activo o de sus zonas contiguas.

Otros agentes, aparecidos con posterioridad al año 2005, son los **dímeros del zanamivir**, caracterizados por ser potentes inhibidores, de acción prolongada, de la neuraminidasa (15).

## 6. EFICACIA DEL ZANAMIVIR Y EL OSELTAMIVIR: FENÓMENOS DE RESISTENCIA A LOS MISMOS POR MUTACIONES VÍRICAS

Limitando el comentario sobre la eficacia de los fármacos que contienen como principio activo zanamivir u oseltamivir, podrían resumirse algunos aspectos de los mismos del siguiente modo: Estos inhibidores de la neuraminidasa se estima que “son eficaces en la quimioprofilaxis y podrían ser empleados en la protección de quienes no están en condiciones de recibir vacunas o no responden a ellas” (16).

Se recomienda el uso de estos fármacos para ser utilizados: o preventivamente o cuanto antes (si se ha producido la infección), pero en todo caso dentro del plazo de 48 horas desde detectarse los síntomas de gripe.

Como era previsible, se han hallado **cepas del subtipo H5N1 resistentes** a dichos inhibidores, originadas como consecuencia de haberse empleado dosis o periodos de tiempo insuficientes en



los tratamientos, al haberse producido mutaciones causantes de sustitución de aminoácidos en la molécula de la neuraminidasa (16).

En el caso de que haya circulación simultánea del virus de la gripe con el SARS-CoV-2, y actuando con el tratamiento adecuado frente a éste, también se aconseja en publicaciones científicas de junio de 2022 y posteriores iniciar el tratamiento con oseltamivir lo antes posible. Esta administración es asimismo compatible con el uso previo de vacunas contra la gripe.

Por otro lado, además de la posibilidad de producirse la mencionada resistencia a los citados inhibidores, se ha descrito que, en ciertos casos (aunque escasamente), estos agentes pueden ocasionar, a veces, **efectos secundarios adversos**, tales como temblores, dificultad para hablar o hinchazón de la cara, fiebre, dolor de garganta, etc.

Finalmente, también se reconocen las **ventajas** de su empleo, como la reducción del tiempo de recuperación de los pacientes de gripe; y se reitera que no reemplazan a las vacunas antigripales, cuyo adecuado uso está garantizado por una ya muy larga práctica.

## 7. REFERENCIAS

1. Cabezas, J. A.; Calvo, P.; Eid, P.; Martín J.; Pérez, N.; Reglero, A.; Hannoun, C. (1980): Neuraminidase from Influenza Virus A(H3N2). *Biochim. Biophys. Acta* 616: 225-238.
2. Cabezas, J. A. (1991): Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase. *Biochem. J.* 278: 311-312.
3. Cabezas, J. A.; Calvo, P.; Martín, J.; Pérez, N.; Reglero, A.; Rodrigo, M.; Hannoun, C. (1982): Characteristics of a neuraminidase released both by bromelain and *N*-laurylsarcosine from Influenza Virus A(H3N2). *Glycoconjugates Proc. VI Int. Symp. Glycoconj.* Tokyo, Japan, 209-210.
4. Cabezas, J. A.; Calvo, P.; Eid, P.; Martín, J.; Pérez, N.; Reglero, A.; Rodrigo, M.; Hannoun, C. (1981): Studies on neuraminidase from Influenza Virus A(H3N2) obtained by two procedures. *Int. J. Biochem.* 14: 311-319.
5. Cabezas, J. A.; Cabezas, M.; Calvo, P.; Martín, J.; Pérez, N.; Hueso, P.; Rodrigo, M.; Reglero, A. (1982): Neuraminidasa de virus de la gripe. *Rev. Esp. Fisiol.* 38 (supl.): 81-86.
6. Cabezas, J. A.; Reglero, A.; Calvo, P. (1983): Glycosidases. (Fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexosaminidases and glucuronidase from some molluscs and vertebrates, and neuraminidase from virus). *Int. J. Biochem.* 15: 243-259.
7. Cabezas, J. A.; Reglero, A.; Hannoun, C. (1983): A Fluorometric Procedure for Measuring Neuraminidase Activity: Its Application to the Determination of This Activity in Influenza and Parainfluenza Viruses. *Anal. Biochem.* 131: 121-126.
8. Cabezas, J. A.; Pérez, N.; Llanillo, M.; Reglero, A.; Calvo, P. (1984): Sialidase Assay by Luminiscence in the Low Picomole-Range of Sialic Acid. Its Application to the Measurement of this Activity in Influenza Virus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365: 415-418.
9. Cabezas, J. A.; Calvo, P.; Llanillo, M.; Rodríguez, J. A.; Hueso, P.; Sánchez-Bernal, C.; Hannoun, C. (1985): Sialidases from Three Influenza Virus Strains (H1N1, H2N2 and H3N2): Characterization and Kinetics. *Glycoconjugate J.* 2: 387-399.
10. Cabezas, J. A.; Milicua, M.; S.-Bernal, C.; Villar, E.; Pérez, N.; Hannoun, C. (1989). Kinetic Studies on the Three Influenza B and Three Influenza A Virus Strains. *Glycoconjugate J.* 6: 219-227.
11. Fiszson, B.; Hannoun, C.; García-Sastre, A.; Villar, E.; Cabezas, J. A. (1989). Comparison of biological and physical properties of human and animal A(H1N1) Influenza Viruses. *Res. Virol.* 140: 395-404.
12. Palese, P. Y.; Compans, R. W. (1976). Inhibition of Influenza Virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J. Gen. Virol.* 33: 159-163.
13. Meindl, P.; Bodo, G.; Palese, P.; Schulman, J.; Tuppy, H. (1974). Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid. *Virology* 58: 457-463.
14. Kim, C. U.; Lew, W.; Willians, M. A. et al. (1997). Influenza neuraminidase Inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: Design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 681-690.
15. Macdonald, S. D. F.; Caneron, R. [...]; Wu, W.-Y.; Tucker, S. P. (2005): Dimeric Zanamivir Conjugates with Various Linking Groups Are Potent Long- Lasting Inhibitors of Influenza Neuraminidase Including H5N1 Avian Influenza. *J. Med.Chem.* 48: 2964-2971.
16. Won Suk Choi, [...], Min Suk Song. (2018): Screening for Neuraminidase Inhibitor Resistance Markers among Avian Influenza Viruses of the N4, N5, N6 and N8 Neuraminidase Subtypes. *J. Virol.* 12(1).

Si desea citar nuestro artículo:

**Neuraminidasa / sialidasa del virus de la gripe: sus características, nomenclatura, medida de actividad, cinética, inhibidores agentes terapéuticos**

José Antonio Cabezas Fernández del Campo

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 409-413

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.07>



# LA VACUNA MVA-COV2-S DESARROLLADA EN EL CNB-CSIC ES ALTAMENTE INMUNOGÉNICA Y COMPLETAMENTE EFICAZ FRENTE AL SARS-COV-2/COVID-19: FUTURO Y OPORTUNIDADES

## THE MVA-COV2-S VACCINE DEVELOPED AT THE CNB-CSIC IS HIGHLY IMMUNOGENIC AND COMPLETELY EFFECTIVE AGAINST SARS-COV-2/COVID-19: FUTURE AND OPPORTUNITIES

Juan García-Arriaza<sup>2</sup> y Mariano Esteban<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>Laboratorio de Poxvirus y Vacunas. Departamento de Biología Molecular y Celular. Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Madrid

corresponding author: jfgarcia@cnb.csic.es; mesteban@cnb.csic.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

La aparición de un nuevo virus emergente a finales del año 2019, identificado posteriormente como SARS-CoV-2, que rápidamente se propagó a la población humana causando la pandemia COVID-19 (con más de 639 millones de personas infectadas y más de 6.6 millones de fallecimientos a fecha de noviembre de 2022), supuso un gran reto para la ciencia y el sistema sanitario mundial con graves consecuencias en la salud y la economía global. En un tiempo récord se produjeron vacunas de distinta naturaleza que demostraron su seguridad y eficacia en ensayos clínicos y cuya administración a la población ha sido clave para frenar la pandemia, evitando contagios, hospitalizaciones y fallecimientos. Nuestro laboratorio en el CNB-CSIC ha participado muy activamente en esta carrera generando un candidato vacunal basado en el poxvirus denominado virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) que demostró en ensayos preclínicos en tres modelos animales (ratón, hámster y macaco) su alta seguridad, robusta inmunogenicidad y completa eficacia frente al virus SARS-CoV-2. En este artículo se describen los pasos que se siguieron desde el laboratorio para culminar con el desarrollo industrial de un candidato vacunal muy prometedor capaz de inducir respuestas inmunitarias potentes y proteger completamente frente a la infección por el coronavirus SARS-CoV-2. La siguiente fase son los ensayos clínicos en humanos. También discutimos sobre otras vacunas, futuro y oportunidades a medio-largo plazo.

#### ABSTRACT

*The appearance of a new emerging virus at the end of 2019, later identified as SARS-CoV-2, which rapidly spread to the human population causing the COVID-19 pandemic (with more than 639 million people infected and more than 6.6 million deaths by November 2022), was a great challenge for science, with serious consequences for the human health system and global economy. In record time, different types of vaccines were produced that demonstrated their safety and efficacy in clinical trials and whose administration to the population has been essential for curbing the pandemic, avoiding infections, hospitalizations and deaths. Our laboratory at the CNB-CSIC has been very active in this race, generating a vaccine candidate based on the poxvirus vector termed modified vaccinia virus Ankara (MVA), which demonstrated in three animal models (mouse, hamster and rhesus macaque) its high safety, robust immunogenicity and full efficacy against SARS-CoV-2 infection. This article describes the steps that we follow it up from the beginning of the pandemic to culminate in the industrial development of a very promising vaccine candidate. The next phase is clinical trials in humans. We also discuss about other vaccines, future and opportunities in the medium-long term.*

#### Palabras Clave:

MVA  
SARS-CoV-2/COVID-19  
vacuna  
inmunogenicidad  
eficacia  
modelos animales

#### Keywords:

MVA  
SARS-CoV-2/COVID-19  
vaccine  
immunogenicity  
efficacy  
animal models





## 1. INTRODUCCIÓN

Cuando la sociedad estaba recuperándose de la crisis económica de 2008, aparece a finales del año 2019 un nuevo virus que iba a producir una de las mayores catástrofes en salud y economía a escala mundial. Un pequeño virus, previamente desconocido, fue transmitiéndose rápidamente entre las personas hasta expandirse por todo el planeta, originando una pandemia de dimensiones asombrosas que a 24 de noviembre de 2022 ha causado más de 639 millones de infectados y 6,62 millones de muertes (sólo en España ha habido 13,5 millones de infectados y 115.000 muertos). Todo empezó en la ciudad china de Wuhan, cuando a mediados de diciembre de 2019 se detectaron casos clínicos de personas que sufrían una enfermedad respiratoria severa, con fiebre alta y neumonía. El 31 de diciembre de 2019 las autoridades sanitarias chinas hicieron pública dicha situación, y debido a la gran capacidad de contagio de dicha enfermedad, se tomaron fuertes medidas para evitar la transmisión, como el aislamiento de los pacientes, un seguimiento exhaustivo de nuevos casos y contactos directos, el cierre del mercado de mariscos foco de la infección y el confinamiento de la población. Mientras tanto, en un tiempo récord, el 12 de enero de 2020, científicos chinos identificaron y publicaron la secuencia genómica del agente infeccioso causante de dicha enfermedad: un nuevo virus, perteneciente a la familia de los coronavirus, al que se denominó coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2)(1,2). A la enfermedad que causa se la nombró como COVID-19 (*CO*rona*V*irus *D*isease 2019, por sus iniciales en inglés).

## 2. DISEÑO DE LA VACUNA MVA-COV2-S

Desde el laboratorio de Poxvirus y Vacunas del CNB-CSIC, que dirige desde el año 1992 el Profesor Mariano Esteban, seguíamos con interés las noticias desde China sobre esta nueva enfermedad, que ya intuíamos que pudiera causar una potencial epidemia. El 13 de enero de 2020, al día siguiente de ser publicada la secuencia del SARS-CoV-2(1,2), decidimos ir adelante en la generación de una vacuna frente al nuevo virus. Ello fue debido a la experiencia de más de 30 años que teníamos con la plataforma de poxvirus como base para la generación de candidatos vacunales frente a múltiples enfermedades infecciosas humanas. Así, previamente habíamos desarrollado candidatos vacunales basados en poxvirus, especialmente utilizando como vector viral el virus vaccinia modificado de Ankara (MVA), frente a distintos patógenos como los virus VIH-1, hepatitis C, chikungunya, zika, y ébola, demostrando en ensayos preclínicos en modelos animales una robusta inmunogenicidad (producción de anticuerpos neutralizantes y activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y una alta eficacia del 80-100% (con los candidatos

vacunales frente a ébola, chikungunya y zika)(3-6). Además, habíamos desarrollado vacunas basadas en MVA frente al VIH-1, subtipos B y C, que se evaluaron en diferentes ensayos clínicos de fase I, tanto profilácticos como terapéuticos, con buenos resultados de seguridad e inmunogenicidad (7-12).

Esta experiencia previa en vectores MVA como candidatos vacunales frente a enfermedades infecciosas humanas nos permitió iniciar de forma rápida la generación de una vacuna frente al SARS-CoV-2. De esta forma, para el diseño de una vacuna frente a la COVID-19 necesitábamos dos componentes principales: 1) el vector viral que utilizaríamos como vehículo, y 2) el antígeno del SARS-CoV-2 a elegir para tratar de inducir buenas respuestas inmunitarias que fueran protectoras.

**1) Vector viral: el poxvirus MVA.** Respecto al vector viral a utilizar, debido a nuestra experiencia previa, no teníamos ninguna duda: el poxvirus denominado virus vaccinia modificado de Ankara (MVA). Los poxvirus son una familia de virus que infectan varias especies animales, poseen un genoma de ADN bicatenario de 130-375 kpb, una cápside ovalada en forma de ladrillo de un tamaño de 300-400 nm x 250-290 nm, una envoltura viral, y presentan una replicación citoplasmática. El miembro más famoso de esta familia es el virus de la viruela, causante de la enfermedad más letal (con más del 30% de mortalidad) que ha padecido la humanidad a lo largo de su historia. La viruela es, además, la única enfermedad humana erradicada de nuestro planeta, desde 1980, y lo fue gracias a una exhaustiva campaña mundial de vacunación promovida y coordinada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) e iniciada en la década de los años 60 del siglo XX. Entre las vacunas más efectivas empleadas destacaron aquellas basadas en el virus vaccinia (VACV). Estas vacunas fueron posteriormente mejoradas y se desarrollaron nuevas vacunas, entre las que destaca el MVA, generado a partir de una cepa del VACV tras más de 570 pases seriados en células de pollo (13). Este proceso dio lugar a la pérdida de alrededor del 10 % del genoma del MVA, incluyendo genes de rango de hospedador, por lo que el MVA está altamente atenuado y no es capaz de replicarse en células humanas. Ello permitió que la cepa MVA se utilizara como vacuna frente a la viruela en Alemania durante la campaña de erradicación de la viruela, donde 120.000 personas fueron vacunadas, no observándose efectos adversos. Posteriormente, a partir de la década de 1990, se empezaron a generar virus MVA recombinantes expresando antígenos de diferentes patógenos y, desde ese momento, se han desarrollado numerosos candidatos vacunales basados en MVA frente a un gran número de enfermedades, los cuales han mostrado resultados prometedores de inmunogenicidad y eficacia en ensayos preclínicos en animales y en ensayos clínicos en seres humanos (14,15).



**2) Antígeno del SARS-CoV-2: la proteína de la espícula (S).** El siguiente paso era decidir qué antígeno del SARS-CoV-2 insertar dentro del MVA, para activar una respuesta inmunitaria capaz de proteger frente a la infección. Para ello era fundamental entender la estructura de los coronavirus. El SARS-CoV-2 es uno de los siete coronavirus que infectan al ser humano, siendo, junto al SARS-CoV-1 y al coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), los únicos coronavirus altamente patogénicos para el ser humano. El SARS-CoV-2, al igual que los otros coronavirus, es un virus con morfología esférica, de 80-160 nm de diámetro, y con una envuelta de bicapa lipídica donde se insertan tres proteínas estructurales: la proteína de la espícula (S), que se proyecta desde la membrana del virus y es la responsable de la unión del virus al receptor, siendo además la principal diana de los anticuerpos neutralizantes; la proteína de membrana (M), implicada en la morfogénesis viral; y la proteína de la envuelta (E), implicada en la morfogénesis viral y que, además, es un factor de virulencia. Dentro del virión se encuentra el genoma viral: una única cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 30 kb, a la cual se le une la proteína de la nucleocápsida (N). Estudios previos con vacunas frente al SARS-CoV-1 y al MERS habían demostrado que el antígeno más inmunogénico y eficaz era la proteína S(16). Por ello decidimos que el antígeno del SARS-CoV-2 a insertar en el MVA fuera el gen que codifica la proteína S, incluyendo su gen completo con los dominios S1 (que contiene el dominio de unión al receptor celular —RBD—, que es la principal diana de anticuerpos neutralizantes), S2 (dominio de fusión) y el dominio transmembrana.

A continuación, el primer paso fue diseñar y generar un plásmido vector de transferencia que contuviera el gen S del SARS-CoV-2 (denominado pCyA-S), necesario para posteriormente insertar dicho gen en el genoma del MVA mediante un proceso de recombinación homóloga en cultivos celulares. El plásmido pCyA-S contiene la secuencia completa del gen S del aislado de Wuhan del SARS-CoV-2 (el único secuenciado en ese momento), regiones flanqueantes del gen de la timidina quinasa (TK) del MVA para permitir la inserción del gen S en dicho *locus* del genoma del MVA, y un gen marcador de selección (LacZ). Tras realizar el diseño por ordenador, se envió a la empresa GeneArt (Thermo Fisher Scientific), la cual sintetizó el gen S y lo clonó en nuestro vector pCyA. A mediados de febrero de 2020 recibimos el plásmido, momento en el que empezamos una carrera contrarreloj para generar una vacuna frente a la COVID-19 en el menor tiempo posible.

### 3. GENERACIÓN DE LA VACUNA MVA-COV2-S

La generación de una vacuna frente a la COVID-19, basada en el vector MVA expresando la proteína S del SARS-CoV-2, y a la que denominamos MVA-CoV2-S, se realizó en cultivos celulares. Células permisivas para el MVA (células DF-1 de pollo) se infectaron con el virus parental MVA-WT y posteriormente se transfectaron con el plásmido pCyA-S, para que tuvieran lugar procesos de recombinación homóloga entre las secuencias del gen TK del virus MVA flanqueando el gen S presentes en el plásmido y el propio gen TK del genoma viral. La progenie viral resultante se recogió y se inició entonces la selección de clones recombinantes que hubieran incorporado el gen S, mediante plaques sucesivos en cultivos celulares. Inicialmente, se seleccionaron durante tres pases seriados aquellas placas virales de color azul que expresaban el marcador  $\beta$ -galactosidasa, el cual se había insertado en el genoma del MVA, junto con el gen S, por dicho proceso de recombinación homóloga. Posteriormente, se realizaron tres nuevos pases seriados y se seleccionaron aquellas placas virales que, tras un nuevo evento de recombinación homóloga, habían eliminado el gen marcador (placas sin color) y solo expresaban la proteína S.

En pleno proceso de generación de la vacuna MVA-CoV2-S, el SARS-CoV-2 se estaba expandiendo de forma exponencial por todo el planeta, llegando a Europa entre finales de febrero y primeros de marzo de 2020, detectándose un gran número de casos de COVID-19 y un significativo porcentaje de fallecimientos. El 11 de marzo de 2020 la OMS declaró a la COVID-19 como una pandemia mundial, y el 14 de marzo se decretó el estado de alarma en España para evitar la expansión del virus, con medidas de urgencia como el confinamiento de la población, restricciones en la circulación y distanciamiento social. Sin embargo, gracias a un salvoconducto, se pudo seguir trabajando en el laboratorio, avanzando firmemente en la generación de la vacuna. Entre finales de marzo y primeros de abril de 2020 se seleccionó una última placa de virus MVA recombinante que expresaba la proteína S y había perdido el gen marcador. Dicha placa viral fue amplificada en cultivos de células DF-1, obteniéndose un *stock* viral maestro del candidato vacunal MVA-CoV2-S que se caracterizó en detalle. Estos experimentos *in vitro* en cultivos celulares, realizados entre abril y mayo de 2020, demostraron que el MVA-CoV2-S expresaba una proteína S completa de unos 180 kDa de peso molecular, formando oligómeros (trímeros), glicosilada y localizada en la membrana de las células infectadas. Además, la vacuna demostró ser altamente estable con todos los clones aislados expresando correctamente la proteína S. La generación de nuestro candidato vacunal se había completado con éxito en el mes de abril del 2020, siendo la vacuna más avanzada en España, estando a la par de otras vacunas que se estaban



desarrollando utilizando vectores virales, como la generada por la Universidad de Oxford/Astrazeneca, que utiliza un adenovirus como vector. En un espacio muy corto de tiempo se estaban elaborando numerosas vacunas frente al SARS-CoV-2 a lo largo del mundo, utilizando distintas estrategias basadas en ácidos nucleicos (ADN y ARNm), proteínas recombinantes, vectores virales, replicones, virus SARS-CoV-2 inactivados o atenuados. Entre todas estas aproximaciones vacunales estaba nuestro candidato vacunal MVA-CoV2-S, que una vez generado de forma satisfactoria fue patentado en 2020 y la patente extendida en 2021.

#### 4. LA VACUNA MVA-COV2-S ES ALTAMENTE INMUNOGENICA Y PROTEGE FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN RATONES

La siguiente etapa implicaba demostrar la inmunogenicidad (capacidad para activar el sistema inmunitario) y eficacia (capacidad para proteger frente a la infección por el SARS-CoV-2) del candidato vacunal MVA-CoV2-S en diferentes modelos experimentales animales, como ratones, hámsteres y macacos; requisitos de las agencias reguladoras para poder probar la vacuna en ensayos clínicos con personas. Los primeros experimentos de inmunogenicidad del MVA-CoV2-S se realizaron en ratones C57BL/6 durante mayo-junio de 2020 en el CNB-CSIC. Grupos de ratones se inmunizaron intramuscularmente con dos dosis de MVA-CoV2-S, espaciadas dos semanas entre sí; y también se probó la combinación de un ADN expresando la proteína S seguida de una segunda dosis con MVA-CoV2-S. Los ratones fueron sacrificados 10 días después de la última dosis, momento en el que se produce un pico de la respuesta inmunitaria (denominada adaptativa), y se analizó la producción de anticuerpos en suero y la activación de células T en esplenocitos. Los resultados fueron espectaculares y muy prometedores. El MVA-CoV2-S, utilizado en diferentes regímenes de inmunización (ADN/MVA y MVA/MVA), activaba de forma muy potente los dos brazos del sistema inmunitario: la producción de anticuerpos y la activación de células T. Por un lado, se indujeron altos niveles de anticuerpos IgG frente a las proteínas S y RBD del SARS-CoV-2, que eran mayoritariamente del isotipo IgG2c, en vez de IgG1, indicativo de una respuesta de tipo Th1. Además, los anticuerpos inducidos eran altamente neutralizantes y evitaban la entrada del SARS-CoV-2 en las células. Por otro lado, se produjo una robusta respuesta inmunitaria celular específica frente al antígeno S, con activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> foliculares cooperadoras, células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, células T CD8<sup>+</sup> residentes de memoria y células T efectoras de memoria. Esta respuesta celular se caracterizaba por la producción de citoquinas de tipo Th1, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-2 y la ausencia de citoquinas de tipo Th2, como IL-4, IL-10 e IL-17. Estos resultados fueron publicados en enero de 2021

y demostraban que el MVA-CoV2-S promueve potentes respuestas inmunitarias humorales y celulares frente al SARS-CoV-2 (17). Además, en estudios posteriores demostramos que la vacunación de ratones C57BL/6 con dos dosis de MVA-CoV2-S es capaz de inducir una respuesta inmunitaria duradera de memoria, al menos 6 meses después de la última inmunización, con activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al SARS-CoV-2, así como altos títulos de anticuerpos IgG frente a las proteínas S y RBD del SARS-CoV-2, que además eran capaces de neutralizar de forma potente al SARS-CoV-2 (18). Todos estos resultados de inmunogenicidad sugerían que el candidato vacunal MVA-CoV2-S podría conferir protección frente a la infección por el SARS-CoV-2.

Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar si efectivamente el MVA-CoV2-S protegía frente a la infección por el SARS-CoV-2. Para realizar estos experimentos de eficacia se necesitaba un tipo especial de ratones transgénicos, denominados K18-hACE2, que expresan el receptor ACE2 (*angiotensin converting enzyme 2*) humano del SARS-CoV-2 y son susceptibles a la infección por el virus. Dichos ratones solo los comercializaba la compañía Jackson, desde Estados Unidos y, a pesar de solicitarlos en marzo, no nos llegaron hasta agosto de 2020, debido a la gran demanda de este modelo animal que era crucial para demostrar la eficacia de las numerosas vacunas que se estaban desarrollando en esa época. Los experimentos de eficacia los realizamos en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA, Valdeolmos, Madrid), perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (y ahora englobado dentro del CSIC), un centro de alta seguridad con categoría NCB-3 que permitía el manejo del SARS-CoV-2 y su inoculación en animales.

Durante agosto-septiembre de 2020, varios grupos de ratones K18-hACE2 fueron inmunizados intramuscularmente con una o dos dosis de MVA-CoV2-S, espaciadas un mes, o con los correspondientes controles. Cinco semanas después, los ratones fueron infectados con el SARS-CoV-2 por vía intranasal y, en los días posteriores, evaluamos una serie de parámetros que determinarían si la vacuna era eficaz y protegía frente a la infección. Los resultados fueron espectaculares y muy prometedores, con un 100 % de protección frente a la morbilidad y mortalidad causada por el SARS-CoV-2 (17,18). Mientras que los ratones no vacunados perdieron peso aceleradamente tras la infección y fallecieron seis días después, los ratones vacunados con dos dosis de MVA-CoV2-S no perdieron peso tras la infección y sobrevivieron. Una dosis de MVA-CoV2-S también era efectiva, y aunque los ratones perdían peso durante los cuatro primeros días tras la infección, lo recuperaron y sobrevivieron. El análisis posterior de las muestras obtenidas mostró que MVA-CoV2-S controlaba la replicación del SARS-CoV-2 en pulmones, reducía la patología pulmonar y los niveles de citoquinas proinflamatorias,

así como que inducía altos niveles de anticuerpos IgG frente a las proteínas S y RBD, y anticuerpos neutralizantes que se correlacionaban con protección (18). De forma adicional, los ratones vacunados con una o dos dosis de MVA-CoV2-S también estaban protegidos frente a una reinfección con SARS-CoV-2(18).

Estos resultados demostraban que MVA-CoV2-S confiere una protección completa frente a la infección por el SARS-CoV-2 en ratones, siendo la pauta de dos dosis mucho más efectiva.

## **5. LA VACUNA MVA-COV2-S ES ALTAMENTE INMUNOGENICA Y PROTEGE FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN HÁMSTERES**

El siguiente paso era confirmar la robusta inmunogenicidad y eficacia de la vacuna MVA-CoV2-S en un nuevo modelo animal, en este caso el hámster, puesto que son necesarios estudios en dos modelos animales diferentes para poder obtener la autorización por parte de las agencias reguladoras para realizar un ensayo clínico de fase I/II con la vacuna. Los hámsteres son susceptibles a la infección por el SARS-CoV-2 y es posible evaluar en ellos la capacidad protectora de las vacunas. Como no teníamos experiencia en hámsteres, iniciamos una colaboración con el grupo del Dr. Kai Dallmeier (Universidad Católica de Lovaina, Bélgica), que habían probado de forma satisfactoria en este roedor una vacuna frente al SARS-CoV-2 basada en el virus de la fiebre amarilla (19). Los resultados que obtuvimos fueron, de nuevo, espectaculares y confirmaban la alta inmunogenicidad y eficacia de MVA-CoV2-S. Tanto una como dos dosis de MVA-CoV2-S, administradas por vía sistémica, protegían a los hámsteres de la infección por SARS-CoV-2, con resultados muy similares a los obtenidos previamente en ratones transgénicos, con altos niveles de anticuerpos IgG frente a las proteínas S y RBD y anticuerpos neutralizantes, así como control de la replicación del SARS-CoV-2 en pulmones y una reducción significativa de la patología pulmonar (20).

## **6. LA VACUNA MVA-COV2-S ES ALTAMENTE INMUNOGENICA Y PROTEGE FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN MACACOS**

Los datos de inmunogenicidad y eficacia obtenidos con el candidato vacunal MVA-CoV2-S en ratones y hámsteres eran suficientes para poder ser presentados a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y obtener su aprobación para la realización de un ensayo clínico inicial de fase I/II en voluntarios sanos, donde se evaluaría la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna. Además, con la intención de acelerar el proceso pre-clínico en animales y poder conseguir autorización para un futuro

ensayo clínico de fase III, al mismo tiempo que la empresa Biofabri generaba los lotes clínicos de la vacuna, iniciamos estudios de seguridad, inmunogenicidad y eficacia de MVA-CoV2-S en macacos.

Los macacos son susceptibles a la infección por el SARS-CoV-2 y estudios en este modelo animal son necesarios para poder evaluar las vacunas en ensayos clínicos de fase III, donde se confirma la seguridad, inmunogenicidad y eficacia.

En España no hay infraestructuras ni personal entrenado en estudios de vacunas en primates no humanos, lo que representaba un gran hándicap para poder realizar nuestro estudio. Tras muchas negativas por parte de expertos en diversos centros del mundo, finalmente llegamos a un acuerdo con el prestigioso Centro de Investigación Biomédica de Primates (BPRC, Países Bajos) para realizar un estudio de seguridad, inmunogenicidad y eficacia de MVA-CoV2-S en macacos, en colaboración con los Dres. Petra Mooij y Gerrit Koopman. El estudio se inició en marzo de 2021, con seis macacos rhesus vacunados con dos dosis intramusculares de MVA-CoV2-S, espaciadas un mes, y otros seis macacos inoculados con el virus control MVA-WT. Un mes después de la última inmunización, los monos fueron infectados con el SARS-CoV-2 y se evaluó la inmunogenicidad inducida y la capacidad de protección. Los resultados obtenidos, al igual que los generados en ratones y hámsteres, confirmaron el espectacular perfil de inmunogenicidad y eficacia inducido por el candidato vacunal MVA-CoV2-S (21). Por un lado, se produjeron altos niveles de anticuerpos IgG frente a las proteínas S y RBD del SARS-CoV-2 y anticuerpos neutralizantes, y por otro lado se activaron células T específicas frente al SARS-CoV-2. De forma importante, la vacuna fue completamente efectiva, reduciendo la carga viral en vías respiratorias bajas (pulmones) y en vías respiratorias altas (garganta y cavidad nasal), así como la patología pulmonar. De gran relevancia fue la potente inhibición de la tormenta de citoquinas proinflamatorias en sangre y lavados broncoalveolares inducida por la vacuna. Dicha tormenta de citoquinas es típica de la infección por el SARS-CoV-2 y es causa principal del fallecimiento de personas con COVID-19.

## **7. LA VACUNA MVA-COV2-S INDUCE ANTICUERPOS QUE NEUTRALIZAN LAS DISTINTAS VARIANTES DEL SARS-COV-2**

Al ser el SARS-CoV-2 un virus ARN y contener un material genético de unos 30.000 nucleótidos era de esperar que a medida que el virus se extendiera entre la población por todos los continentes, se produjeran mutaciones en su genoma y que éstas afectaran al virus bien positivamente, haciéndole más transmisible, o negativamente, con menor virulencia. La secuencia hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 se considera como la primera en infectar a los humanos y se la reconoce como la secuencia cero. Sin embargo,



pronto y por secuenciación de genomas virales se empezó a describir la presencia de variantes del SARS-CoV-2, en un principio conteniendo pocas mutaciones, con preferencia en la proteína S, y a medida que pasaba el tiempo estos virus fueron evolucionando y dominando entre la población. Las diferentes variantes del SARS-CoV-2 se clasificaron con nombres del alfabeto griego, según el aumento de la transmisibilidad, virulencia y disminución de la eficacia frente a otros tratamientos. A aquellas variantes con mayor peligrosidad se las denominó variantes de preocupación (VOC), e incluyen por orden de aparición las variantes alfa (linaje B.1.1.7), beta (linaje B.1.351), gamma (linaje P.1), delta (linaje B.1.617.2) y ómicron (linaje B.1.1.529). Recientemente han aparecido nuevos linajes de ómicron, como BA.4 y BA.5, que predominan actualmente en el mundo, con gran número de mutaciones y más resistentes a la acción de las vacunas.

Teniendo en cuenta la presencia de diferentes variantes del SARS-CoV-2, fue por lo tanto esencial demostrar que la vacuna MVA-CoV2-S era capaz de inducir anticuerpos que neutralizaran las distintas variantes de preocupación. De esta forma, en sueros procedentes de ratones, hámsteres y macacos que habían sido previamente vacunados con MVA-CoV2-S, se determinó su capacidad de unirse a la proteína S, así como de neutralizar a las distintas variantes de preocupación. Los resultados obtenidos fueron muy relevantes y demuestran que los sueros de ratones (18), hámsteres (20) y macacos (21) vacunados con MVA-CoV2-S eran capaces de neutralizar todas las variantes de preocupación (alfa, beta, gamma, delta y ómicron), aunque el grado de neutralización variaba, siendo las variantes beta y ómicron las más resistentes, particularmente ómicron. No obstante, en todos los casos se producían anticuerpos de unión a la proteína S y anticuerpos neutralizantes, lo que avalaba la potencia inmunogénica de la vacuna MVA-CoV2-S (18, 20-21).

## **8. LA VACUNACIÓN CON MVA-COV2-S PROTEGE FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN EL CEREBRO DE RATONES TRANSGÉNICOS**

Una de las manifestaciones clínicas más preocupantes en las personas que han sido infectadas por el SARS-CoV-2 es el llamado efecto "*long COVID*" o COVID persistente, con una variedad de síntomas nuevos, recurrentes o continuos, mucho tiempo después de la recuperación, pudiendo durar meses o años. Esto puede deberse a que las personas que tuvieron COVID-19 podrían tener daños en el cerebro, o en otros órganos o tejidos como el corazón, los riñones o la piel, así como inflamación y problemas en el sistema inmunitario. Para determinar la capacidad del SARS-CoV-2 para infectar el cerebro, establecimos una colaboración con el grupo del Dr. Juan José Toledo Aral y el Dr. José López Barneo del Instituto

de Biomedicina de Sevilla (IBIS). Utilizando ratones transgénicos K18-hACE2, susceptibles a la infección por el SARS-CoV-2, nos preguntamos si el virus era capaz de alcanzar el cerebro, qué ruta utilizada para infectar el cerebro, las zonas cerebrales que podrían estar afectadas y si la vacunación con MVA-CoV2-S podría proteger frente a la infección cerebral y al daño tisular. Así pues, se inmunizaron ratones con una o dos dosis de la vacuna MVA-CoV2-S, posteriormente se les inoculó por vía intranasal el SARS-CoV-2 y a diferentes días post-infección se sacrificaron animales y los cerebros fueron procesados histológicamente para analizar la presencia del virus y determinar los daños producidos. Los resultados obtenidos, mostraron que los ratones no vacunados e infectados con SARS-CoV-2 tenían zonas del cerebro, particularmente el córtex y el hipotálamo, infectadas con el virus, ocurriendo la replicación del virus principalmente en las neuronas y produciéndose alteraciones patológicas importantes, como pérdida neuronal, signos incipientes de activación glial y daño vascular. Además, se determinó que la ruta de entrada en el cerebro utilizada por el virus fue la hemato-encefálica. Contrariamente, y de forma muy relevante, los cerebros de los ratones que fueron vacunados con una o dos dosis de MVA-CoV2-S estaban totalmente protegidos, con ausencia de infección en todas las áreas del cerebro y su daño asociado (22). Esta protección se mantuvo incluso después de la reinfección por SARS-CoV-2. El hecho de que una o dos dosis de la vacuna MVA-CoV2-S confirieran total protección del cerebro frente a la infección por SARS-CoV-2, sugiere que el COVID persistente podría ser controlado por la vacunación con MVA-CoV2-S.

## **9. GENERACIÓN DE UNA VACUNA OPTIMIZADA MVA-COV2-S(3P), EXPRESANDO UNA PROTEÍNA S ESTABILIZADA EN PREFUSIÓN, QUE ES MÁS INMUNOGENICA Y EFICAZ QUE MVA-COV2-S**

Todos los resultados obtenidos en estos tres modelos animales (ratón, hámster y macaco) confirmaban que la vacuna MVA-CoV2-S, que expresa una proteína S nativa sin estabilizar, es segura, muy inmunogénica y altamente eficaz. Sin embargo, con el fin de tratar de aumentar la inmunogenicidad y eficacia de dicha vacuna, a la vez que mantuviera una mayor amplitud de respuesta inmune frente a las distintas variantes del SARS-CoV-2, generamos un nuevo candidato vacunal basado en MVA expresando una proteína S optimizada, a la que se le había mutado el dominio de furina para prevenir el corte proteolítico entre S1 y S2 y se le introdujeron tres sustituciones de aminoácidos a prolina, con el fin de estabilizar la proteína S en prefusión. Este nuevo candidato vacunal optimizado fue denominado MVA-CoV2-S(3P) (23). Infecciones en cultivos celulares mostraron que MVA-CoV2-S(3P) producía mayores niveles





de la proteína S en el citoplasma y en la membrana celular que la proteína S nativa producida por MVA-CoV2-S. Posteriormente, el estudio de la inmunogenicidad en ratones C57BL/6 y ratones transgénicos K18-hACE2 mostró que una sola dosis de MVA-CoV2-S(3P) indujo mayores niveles de anticuerpos IgG y anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 parental y diferentes variantes de preocupación que MVA-CoV2-S(23). De forma relevante, una sola dosis de MVA-CoV2-S(3P), administrada por vía intramuscular, fue mucho más eficaz que MVA-CoV2-S, protegiendo a todos los ratones K18-hACE2 de la morbilidad y mortalidad causadas por la infección por SARS-CoV-2, reduciendo la carga viral, las lesiones histopatológicas y los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en los pulmones (23). Estos resultados demostraron que la expresión por parte del vector MVA de una nueva proteína S del SARS-CoV-2 estabilizada en prefusión mejoró la inmunogenicidad y la eficacia contra el SARS-CoV-2 y sus variantes en ratones, en comparación con MVA-CoV2-S, respaldando la entrada en ensayos clínicos de la nueva vacuna optimizada MVA-CoV2-S(3P).

###### **10. LAS VACUNAS MVA-COV2-S Y MVA-COV2-S(3P) SON INMUNOGÉNICAS Y EFICACES DESPUÉS DE SU ADMINISTRACIÓN POR VÍA INTRANASAL, SIENDO MVA-COV2-S(3P) EL CANDIDATO VACUNAL MÁS INMUNOGÉNICO Y EFICAZ**

La característica de la infección por SARS-CoV-2 es que ésta se produce a través de las vías respiratorias. Las vacunas actuales contra la COVID-19 se administran por ruta intramuscular, pero esta vía de administración no ha conseguido prevenir la infección por SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores, ni la transmisión entre personas, principalmente debido a la ausencia de una respuesta inmunitaria de mucosas. Los datos preclínicos con las vacunas MVA-CoV2-S o MVA-CoV2-S(3P) fueron obtenidos después de su administración por ruta intramuscular, la misma ruta utilizada por todas las vacunas actuales frente al coronavirus SARS-CoV-2. Dado que en estas condiciones sistémicas se activan fundamentalmente los anticuerpos IgG, mientras que en la infección del virus por vía respiratoria se induce en las mucosas anticuerpos IgA que bloquean la entrada del virus, era necesario demostrar que las vacunas MVA-CoV2-S y MVA-CoV2-S(3P) eran inmunogénicas y protectoras frente a la infección por el coronavirus SARS-CoV-2 cuando son administradas por la ruta intranasal. Para ello, evaluamos en ratones la inmunogenicidad y eficacia tras la administración por vía intranasal de una sola dosis de MVA-CoV2-S o MVA-CoV2-S(3P) (24). Los resultados de inmunogenicidad en ratones C57BL/6 mostraron que MVA-CoV2-S y MVA-CoV2-S(3P) indujeron anticuerpos IgG e IgA específicos de la proteína S, en suero y en lavados broncoalveolares, respectivamente, y anticuerpos neutralizantes contra

el SARS-CoV-2 parental, así como frente a diferentes variantes de preocupación (VoC), siendo MVA-CoV2-S(3P) el candidato vacunal más inmunogénico(24). Además, también se indujeron respuestas inmunitarias locales (en pulmones y ganglios linfáticos broncoalveolares) o sistémicas (en bazo) de células T CD4+ y CD8+ específicas frente al SARS-CoV-2, que son de tipo Th1 y altamente polifuncionales (24). De forma relevante, el estudio de la eficacia en ratones transgénicos K18-hACE2 mostró que una sola dosis por vía intranasal de MVA-CoV2-S y MVA-CoV2-S(3P) protegió a todos los ratones de la morbilidad y mortalidad causadas por la infección por SARS-CoV-2, siendo MVA-CoV2-S(3P) el candidato vacunal más eficaz. El análisis de las muestras obtenidas, mostró la ausencia de virus infeccioso en los pulmones y lavados nasales de los ratones vacunados, lo que sugiere que la vacunación habría producido una inmunidad esterilizante, objetivo final de todas las vacunas. Este control de la replicación del virus, se correlacionó con los altos títulos de IgG específicas de S y de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 parental y diferentes variantes de preocupación, inducidos por la vacunación. Además, en los ratones vacunados, principalmente en aquellos con MVA-CoV2-S(3P), apenas hubo lesiones histopatológicas pulmonares y los niveles de citoquinas proinflamatorias en pulmones y lavados nasales fue muy bajo (24). Todos estos resultados demuestran que una sola inoculación por vía intranasal de las vacunas MVA-CoV2-S y MVA-CoV2-S(3P) indujo potentes respuestas inmunitarias celulares y humorales, ya sea locales o sistémicas, y protegió al 100% de los ratones de la morbilidad y mortalidad causada por la infección por SARS-CoV-2.

###### **11. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LOTES CLÍNICOS DE LAS VACUNAS MVA-COV2-S Y MVA-COV2-S(3P)**

Antes de realizar un ensayo clínico con una vacuna es necesario producir dicha vacuna mediante unas buenas prácticas de fabricación (GMP), donde se controla la calidad del producto producido y que permite generar millones de dosis. Este proceso fundamental no lo podíamos realizar en el laboratorio, por lo que necesitábamos colaborar con una empresa que fuera capaz de producir los lotes clínicos de las vacunas producidas. La búsqueda de dicha empresa la iniciamos en abril de 2020 y fue ardua, compleja y llena de obstáculos. Inicialmente nos contactó una empresa alemana para producir ellos la vacuna, pero se consideró por parte del CSIC y el Ministerio de Ciencia e Innovación que la mejor opción era realizar la producción de la vacuna en una empresa española. La perseverancia tuvo sus frutos y en mayo-junio de 2020 llegamos a un acuerdo con la empresa Biofabri (O Porriño, Pontevedra), perteneciente al grupo Zendal, que es un referente mundial en la producción de vacunas veterinarias frente a enfermedades animales.



De esta forma, en junio de 2020 le transferimos a Biofabri el candidato vacunal MVA-CoV2-S generado en el laboratorio y la empresa se puso manos a la obra para desarrollar el plan de producción de los lotes clínicos de dicha vacuna. Dicho proceso fue lento y requirió de mucho esfuerzo e inversión, pues la empresa tuvo que empezar literalmente desde cero, siguiendo las pautas que nuestro laboratorio del CNB-CSIC aportaba de conocimientos (*know-how*) sobre crecimiento y manipulación del MVA, generando bancos maestros de células donde crecer el virus recombinante, y bancos maestros de la vacuna que había que caracterizar en detalle para demostrar que cumplían con todos los requisitos de calidad requeridos por la AEMPS. El proceso de generación de los lotes clínicos GMP se fue alargando, hasta que finalmente se obtuvieron durante la primavera de 2021.

Durante ese intervalo de tiempo, íbamos avanzando en los estudios con el candidato vacunal MVA-CoV2-S en ratones, hámsteres y macacos descritos previamente; y, por otro lado, íbamos generando y caracterizando la nueva vacuna optimizada MVA-CoV2-S(3P), descrita con anterioridad. Los espectaculares resultados obtenidos con MVA-CoV2-S(3P) en ratones, también confirmados en hámsteres, donde demostramos que una sola dosis de dicha vacuna es más inmunogénica y eficaz que MVA-CoV2-S, nos hicieron tomar la decisión de que esta nueva vacuna optimizada fuera la elegida para que entrara en ensayos clínicos. De esta forma, enviamos el nuevo candidato vacunal MVA-CoV2-S(3P) a Biofabri en la primavera de 2021, y esta vez en poco tiempo, gracias a todo el trabajo de puesta a punto desarrollado durante el año anterior, conseguimos tener listos los lotes clínicos GMP de dicha vacuna en julio de 2021.

## 12. ENSAYO CLÍNICO DE LA VACUNA MVA-COV2-S(3P)

Una vez completada toda la fase preclínica en tres modelos animales, estábamos en condiciones de poder presentar los resultados a las agencias reguladoras para la aprobación e inicio de los ensayos clínicos, habida cuenta de que para las fases I/II solo se necesitaban los resultados de seguridad, inmunogenicidad y eficacia en dos modelos animales distintos (como ratón y hámster) y para la fase III se necesitaba el modelo de macaco, más cercano al humano. Conjuntamente con el CSIC, Biofabri y la CRO Optimapharm, se preparó un dossier completo con toda la información requerida por parte de la AEMPS, que incluyó los datos preclínicos de la vacuna MVA-CoV2-S y de su forma optimizada MVA-CoV2-S(3P), así como los controles de calidad de los lotes GMP producidos. Dicha información se envió en julio de 2021 a la AEMPS, que tras su evaluación nos requirió una serie de aclaraciones, las cuales fueron reenviadas a finales de septiembre del mismo año. Sin embargo, conforme pa-

saba el tiempo, la mayoría de las personas en España ya estaban vacunadas con la pauta completa y era cada vez más complicado buscar personas no vacunadas para realizar un ensayo clínico con nuestra vacuna, por lo que se consideró que la mejor opción era utilizar la vacuna MVA-CoV2-S(3P) como dosis de recuerdo en personas ya inmunizadas con las vacunas de ARNm. Por ello, retiramos la solicitud de ensayo clínico inicialmente propuesta en la AEMPS, se incorporaron más datos en los dossieres informativos y se envió a la Agencia Europea del Medicamento (EMA) un informe para solicitar su consejo, el cual hemos recibido recientemente, y avala la realización de dicho ensayo clínico utilizando MVA-CoV2-S(3P) como dosis de refuerzo. Por otro lado, otros organismos como la OMS y empresas internacionales han mostrado interés en nuestra vacuna, cuyas negociaciones continúan.

El ensayo clínico de fase I propuesto consiste en evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna optimizada MVA-CoV2-S(3P) en 45 personas sanas que previamente han sido vacunadas con tres dosis de la vacuna de ARNm. A 15 voluntarios se les administrará una dosis de la vacuna con  $10^7$  PFU/dosis, otros 15 recibirán una dosis mayor de  $10^8$  PFU/dosis, y como control otros 15 individuos recibirán una dosis de la vacuna de ARNm. Si los resultados de seguridad e inmunogenicidad (anticuerpos totales y neutralizantes) obtenidos son prometedores, es decir ausencia de efectos adversos y demostrada superioridad inmunogénica frente a personas vacunadas con ARNm, se realizaría a continuación un ensayo de fase II en un mayor número de personas, donde evaluaremos, de nuevo, la seguridad y la inmunogenicidad, y si sigue demostrando superioridad sobre la vacuna de ARNm, pasará a la fase clínica III con mayor número de voluntarios. Estos pasos serán fundamentales para poder administrar la vacuna a la población como dosis de recuerdo en un futuro próximo.

## 13. DESARROLLO DE OTRAS VACUNAS Y SITUACIÓN ACTUAL

El desarrollo de vacunas frente a la COVID-19 ha sido uno de los grandes desafíos científicos y tecnológicos a nivel global para poder controlar la infección por el coronavirus SARS-CoV-2, que se transmitía a grandes velocidades entre la población desde principios del año 2020. Tan pronto como se conoció la secuencia completa del genoma del SARS-CoV-2, todos aquellos grupos con experiencia en vacunas iniciamos una carrera maratónica para conseguir vacunas eficaces. Fruto de este esfuerzo fue la obtención de varios candidatos vacunales que rápidamente entraron en fases preclínicas y clínicas, con lo que a finales del año 2020 ya se habían producido varias vacunas basadas en vectores de adenovirus, ácidos nucleicos (ADN y ARNm), proteínas y virus inactivado, lo que permitió, una vez demostrada su alta eficacia, que se iniciara el proceso de vacunación



en varios países, que fue acelerando e incrementando la cobertura vacunal en la población. En Europa las primeras vacunas aprobadas por la EMA fueron dos vacunas que utilizaban ARNm (Moderna y Pfizer/BioNTech) y otras dos vacunas que utilizaban adenovirus como vector (Astrazeneca y Janssen), todas expresando la proteína S del virus. Se produjeron miles de millones de dosis, lo que permitió que en países como España se alcanzara más del 90% de vacunación frente al SARS-CoV-2 a finales del año 2021. No obstante, la vacunación no se ha producido de forma homogénea entre todos los países, con continentes como el africano con gran parte de la población no vacunada, lo que ha acrecentado la desigualdad entre los países ricos y los pobres. Sin embargo, los logros importantes a resaltar en el tercer trimestre del 2022 son los siguientes: que la vacunación ha sido masiva, que se han obtenido altos porcentajes de eficacia entre el 70-95%, que se ha conseguido parar la extensión y controlar la pandemia, y que se han podido salvar en el mundo millones de vidas. Se trata de uno de los logros más importantes en salud global, sólo comparable con la campaña de vacunación de la viruela, una de las más letales enfermedades infecciosas humanas que gracias a la vacunación masiva se consiguió erradicar de nuestro planeta.

A pesar del programa masivo de vacunación que ha evitado que la infección por SARS-CoV-2 progresara hacia COVID-19 y causara más muertes, el virus aún permanece en circulación, por lo que las autoridades sanitarias recomiendan la administración periódica de dosis de recuerdo de la vacuna, encontrándonos actualmente con la cuarta dosis, administrada inicialmente en las personas mayores de 80 años, pero que se extenderá progresivamente a otros rangos de edad. Es predecible que el virus se mantenga entre las personas produciendo periódicamente episodios similares a la gripe de corta duración, unos tres-cuatro días. No obstante, debemos de mantener la alerta con seguimientos epidemiológicos sobre la aparición de variantes que irán surgiendo entre la población vacunada y no vacunada, y asegurar su sensibilidad o resistencia a la vacunación. Nuevas vacunas duales dirigidas frente a distintas variantes, como la dual de Wuhan y ómicron, empezarán a administrarse en el otoño del 2022 entre la población más vulnerable. Esta pandemia, aunque controlable con las vacunas actuales, nos puede seguir produciendo sorpresas, por lo que la vigilancia y seguimiento es primordial. Nuevas vacunas con mayor espectro de acción que las actuales, sobre todo en durabilidad, al igual que la combinación de las mismas y desarrollo de aquellas con capacidad esterilizante en las vías respiratorias, son esenciales para el futuro. La vacuna MVA-CoV2-S(3P) que hemos generado en el CNB-CSIC representa una buena opción para ser utilizada en combinación con otras vacunas, ampliando la eficacia y duración de las respuestas inmunológicas

frente al SARS-CoV-2/COVID-19. De forma adicional, también hemos generado otro candidato vacunal, MVA-CoV2-S(3P)-ómicron, para uso combinado con otras vacunas. La vacunación a nivel global nos ayudará a mantener al coronavirus SARS-CoV-2 bajo control y como virus residual.

## 14. RELEVANCIA, DESAFÍO Y OPORTUNIDADES A MEDIO-LARGO PLAZO

El hecho de que durante más de dos años la pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2 haya paralizado el sistema socio-económico de los países causando altos porcentajes de mortalidad en la población y grandes pérdidas económicas, nos ha demostrado la debilidad de nuestro sistema de protección frente a agentes infecciosos. Creíamos que podríamos actuar con rapidez frente a enfermedades emergentes, lo que no ha sido así frente al SARS-CoV-2. Ello ha alertado a los gobiernos y a sus sistemas sanitarios y de vigilancia a planificar con antelación, lo que requiere de políticas adecuadas para evitar que situaciones como las ocurridas durante la pandemia COVID-19 vuelvan a producirse. Pero la pregunta es si realmente se están tomando las medidas adecuadas o rápidamente nos olvidaremos de lo ocurrido y esperaremos a que vengan otros a solucionar el problema de otra pandemia en el futuro. Esto es algo que la sociedad demanda, exigiendo que se tomen las medidas de vigilancia epidemiológica y de contención adecuadas para que tragedias como la vivida, con el virus aún circulando entre nosotros, no se repitan.

Gracias a la ciencia se pudo identificar con rapidez el virus causante de una nueva enfermedad aparecida en la ciudad China de Wuhan, a finales del año 2019, publicándose a mediados de enero de 2020 la secuencia del nuevo coronavirus, bautizado como SARS-CoV-2. Estudios recientes sugieren que el virus pudo provenir del perro mapache o mapache japonés. Los científicos que trabajábamos en el desarrollo de vacunas disponíamos de los conocimientos y experiencia necesarios para poder desarrollar candidatos vacunales con rapidez. Fruto de ello es que en apenas dos meses, gracias a colaboraciones público-privadas, ya se disponían de diferentes candidatos vacunales basados en distintas tecnologías. En pocos meses se pudieron realizar los ensayos preclínicos y clínicos con dichos candidatos vacunales que condujeron a la aprobación de diferentes vacunas, que estuvieron disponibles así para iniciar la vacunación masiva de la población en diciembre de 2020. Sin embargo, pronto surgieron los problemas de obtención de suficientes dosis para administrar a las personas, lo que puso en evidencia que países como España no dispusiéramos de las infraestructuras necesarias ni empresas con capacidad de producción de vacunas de uso



humano. En nuestro país se ha realizado un gran esfuerzo, pero la pregunta es si se van a mantener los grupos científicos y las infraestructuras necesarias para seguir vigilantes, teniendo la capacidad de poder actuar con rapidez y producir las vacunas necesarias. España dispone de excelentes científicos, pero posee un déficit notable en puestos de trabajo y es necesaria la consolidación de los científicos que llevan años arrastrando contratos precarios.

La salud de los ciudadanos corresponde a las autoridades sanitarias y a los máximos representantes políticos a los que elige la ciudadanía por procedimientos democráticos. Es precisamente el Congreso de los Diputados y los Ministerios de Sanidad, Ciencia e Innovación y Defensa quienes deben actuar con diligencia frente a situaciones que afectan a toda la ciudadanía como epidemias y pandemias, procediendo a utilizar los mecanismos disponibles para la mejora de la salud. La pandemia COVID-19, con los errores y aciertos, ha puesto de manifiesto nuestra debilidad y fortaleza. Aprendamos pues de esta tragedia causada por un agente infeccioso para que no vuelva a ocurrir. La pandemia COVID-19, a la que todos estamos expuestos y muchos hemos padecido, ha abierto muchos frentes político-sociales sobre debilidades y fortalezas que se han visto reflejadas en intensos debates públicos sobre nuestro sistema sanitario y modo de actuación del Gobierno y Comunidades Autónomas. La sociedad exige que lo aprendido no caiga en saco roto, sino más bien nos sirva para fortalecernos como país. Pero realmente, ¿no va a ocurrir que la sociedad y los políticos quieran olvidarse de lo ocurrido y cerrar los ojos?. Actuemos pues con políticas firmes que auguren un futuro más seguro en cuanto a actuaciones frente a patógenos y otros agentes biológicos.

El mayor desafío es evitar que los patógenos causen mortalidad en las personas y buscar los remedios para evitarlo. Afortunadamente, las vacunas son el remedio más eficaz de control frente a los agentes infecciosos. Recordemos que la viruela ha causado una de las mayores tragedias humanas en vidas y que gracias a un programa de vacunación masivo orquestado por la OMS se erradicó dicha enfermedad en el año 1980. Así pues, debemos de prepararnos para desarrollar vacunas y terapias capaces de controlar aquellos agentes mortales infecciosos para la especie humana que puedan surgir en un futuro. Entre la lista de agentes infecciosos más peligrosos reseñados por la OMS que pueden causar epidemias están: fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Ebola, Marburgo, Nipah, SARS-CoV-1, MERS, Fiebre Lassa y Fiebre del Valle del Rift, y la siempre temida gripe. El control de los patógenos emergentes y reemergentes requiere de la voluntad del gobierno de la nación para poder contar de forma estable con una estructura sólida entre científicos, sanitarios y tejido productivo empresarial, que puedan actuar con rapidez y reducir tragedias como la ocurrida con la pan-

demia de SARS-CoV-2/COVID-19. Futuras epidemias y pandemias llegarán y será fundamental disponer de dichas estructuras científico-sanitarias-empresariales que nos permitan intervenir con rapidez y eficacia.

### Agradecimientos

El trabajo realizado ha sido financiado por distintos proyectos de investigación otorgados por diferentes instituciones: Fondo COVID-19 COV20/00151 [Ministerio de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)], Fondo Supera COVID-19 (Crue Universidades-Banco Santander), proyectos intramurales especiales del CSIC (202120E079 y 2020E84), proyecto PID2020-114481RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN)/Agencia Española de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033, proyecto CF01-00008 de la Fundación La Caixa, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC) cofinanciado con fondos FEDER, así como donaciones de Ferrovial y MAPFRE. Por otro lado, esta investigación ha sido también financiada por la Comisión Europea-NextGenerationEU, a través de la Plataforma de Salud Global del CSIC (PTI Salud Global). También agradecemos el apoyo económico de la Agencia Estatal de Investigación AEI/10.13039/501100011033, a través del Programa de Centros de Excelencia en I+D+i "Severo Ochoa" (SEV-2017-0712).

Agradecimiento al personal del laboratorio de Poxvirus y Vacunas del CNB-CSIC por su implicación en el desarrollo de vacunas frente al SARS-CoV-2, y muy especialmente a la Dra. Patricia Pérez Ramírez, así como a David Astorgano y Guillermo Albericio. También nuestro agradecimiento a la Vicepresidencia de Investigación Científica y Técnica (VICYT) del CSIC (Dres. Jesús Marco, Ana Castro y Ana Sanz) y a la empresa Biofabri (Dres. Esteban Rodríguez y Eugenia Puentes) por el excelente asesoramiento y apoyo continuo para el buen hacer del proyecto y su desarrollo clínico. Por otro lado, agradecemos a los Dres. Kai Dallmeier (Universidad de Lovaina, Bélgica), Petra Mooij y Gerrit Koopman (BPRC, Países Bajos) por su importante colaboración con los experimentos en hámsteres y macacos, respectivamente. Nuestro agradecimiento se hace extensivo también a distintos servicios del CNB (histología, animalario, unidad bioinformática, citometría de flujo, entre otros), así como al Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)-CSIC (Valdeolmos, Madrid, Spain) por facilitar una zona NCB-3 para los experimentos de eficacia de la vacuna en ratones.

Este artículo representa una extensión actualizada sobre el desarrollo de la vacuna MVA-CoV2-S y su comportamiento en tres modelos animales, descrito previamente en parte en 2020 (Esteban, M. & García-Arriaza, J. Hacia la vacuna española contra el SARS-CoV-2, causante de la pandemia COVID-19. Anales de la Real Aca-



demia Nacional de Medicina de España. Vol. 137, Nº 02, páginas 234-238, 2020. DOI: 10.32440/ar.2020.137.02.rev18) y 2021 (García-Arriaza, J. Desarrollo de una vacuna española frente a la COVID-19 basada en el poxvirus MVA: Del laboratorio a la clínica". Revista Virología de la Sociedad Española de Virología, Vol. 24, Nº 1/2021).

## 15. REFERENCIAS

1. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):565-574.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733.
3. García-Arriaza J, Cepeda V, Hallengård D, Sorzano CO, Kümmerer BM, Liljeström P, Esteban M. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection. *J Virol*. 2014 Mar;88(6):3527-47.
4. Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, Gosse L, Dereuddre-Bosquet N, Tchitchek N, Hallengård D, García-Arriaza J, Meinke A, Esteban M, Merits A, Le Grand R, Liljeström P. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight*. 2017 Mar 23;2(6):e83527.
5. Pérez P, Q Marín M, Lázaro-Frías A, Jiménez de Oya N, Blázquez AB, Escribano-Romero E, S Sorzano CO, Ortego J, Saiz JC, Esteban M, Martín-Acebes MA, García-Arriaza J. A Vaccine Based on a Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Expressing Zika Virus Structural Proteins Controls Zika Virus Replication in Mice. *Sci Rep*. 2018 Nov 26;8(1):17385.
6. Lázaro-Frías A, Gómez-Medina S, Sánchez-Sampedro L, Ljungberg K, Ustav M, Liljeström P, Muñoz-Fontela C, Esteban M, García-Arriaza J. Distinct Immunogenicity and Efficacy of Poxvirus-Based Vaccine Candidates against Ebola Virus Expressing GP and VP40 Proteins. *J Virol*. 2018 May 14;92(11):e00363-18.
7. Gómez CE, Nájera JL, Perdiguero B, García-Arriaza J, Sorzano CO, Jiménez V, González-Sanz R, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MA, López Bernaldo de Quirós JC, Guardo AC, García F, Gatell JM, Plana M, Esteban M. The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):11468-78.
8. García F, Bernaldo de Quirós JC, Gómez CE, Perdiguero B, Nájera JL, Jiménez V, García-Arriaza J, Guardo AC, Pérez I, Díaz-Brito V, Conde MS, González N, Alvarez A, Alcamí J, Jiménez JL, Pich J, Arnaiz JA, Maleno MJ, León A, Muñoz-Fernández MA, Liljeström P, Weber J, Pantaleo G, Gatell JM, Plana M, Esteban M. Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02). *Vaccine*. 2011 Oct 26;29(46):8309-16.
9. Mothe B, Climent N, Plana M, Rosàs M, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MÁ, Puertas MC, Carrillo J, Gonzalez N, León A, Pich J, Arnaiz JA, Gatell JM, Clotet B, Blanco J, Alcamí J, Martínez-Picado J, Alvarez-Fernández C, Sánchez-Palomino S, Guardo AC, Peña J, Benito JM, Rallón N, Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M, López Bernaldo de Quirós JC, Brander C, García F; RISVAC-03 Study Group. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia Ankara-based HIV-1 vaccine (MVA-B) in HIV-1-infected patients alone or in combination with a drug to reactivate latent HIV-1. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(6):1833-42.
10. Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Cepeda V, Sánchez-Sorzano CO, Mothe B, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MÁ, Gatell JM, López Bernaldo de Quirós JC, Brander C, García F, Esteban M. A Phase I Randomized Therapeutic MVA-B Vaccination Improves the Magnitude and Quality of the T Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Subjects on HAART. *PLoS One*. 2015 Nov 6;10(11):e0141456.
11. Guardo AC, Gómez CE, Díaz-Brito V, Pich J, Arnaiz JA, Perdiguero B, García-Arriaza J, González N, Sorzano COS, Jiménez L, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MÁ, Gatell JM, Alcamí J, Esteban M, López Bernaldo de Quirós JC, García F, Plana M; RISVAC02boost study. Safety and vaccine-induced HIV-1 immune responses in healthy volunteers following a late MVA-B boost 4 years after the last immunization. *PLoS One*. 2017 Oct 24;12(10):e0186602.
12. Joseph S, Quinn K, Greenwood A, Cope AV, McKay PF, Hayes PJ, Kopycinski JT, Gilmour J, Miller AN, Geldmacher C, Nadai Y, Ahmed MI, Montefiori DC, Dally L, Bouliotis G, Lewis DJ, Tatoud R, Wagner R, Esteban M, Shattock RJ, McCormack S, Weber J. A Comparative Phase I Study of Combination, Homologous Subtype-C DNA, MVA, and Env gp140 Protein/Adjuvant HIV Vaccines in Two Immunization Regimes. *Front Immunol*. 2017 Feb 22;8:149.
13. Mayr A, Stickl H, Muller HK, Danner K, Singer H. The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism. *Zentralbl Bakteriol B* 1978 167:375-390.
14. Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M. Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain. *Expert Rev Vaccines*. 2013 Dec;12(12):1395-416.



15. Volz A, Sutter G. Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. *Adv Virus Res.* 2017;97:187-243.
16. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Aug;14(8):523-34.
17. García-Arriaza J, Garaigorta U, Pérez P, Lázaro-Frías A, Zamora C, Gastaminza P, Del Fresno C, Casasnovas JM, Sorzano CÓS, Sancho D, Esteban M. COVID-19 vaccine candidates based on modified vaccinia virus Ankara expressing the SARS-CoV-2 spike induce robust T- and B-cell immune responses and full efficacy in mice. *J Virol.* 2021 Jan 7;95(7):e02260-20.
18. Lázaro-Frías A, Pérez P, Zamora C, Sánchez-Cordón PJ, Guzmán M, Luczkowiak J, Delgado R, Casasnovas JM, Esteban M, García-Arriaza J. Full efficacy and long-term immunogenicity induced by the SARS-CoV-2 vaccine candidate MVA-CoV2-S in mice. *NPJ Vaccines.* 2022 Feb 9;7(1):17.
19. Sanchez-Felipe L, Vercruysse T, Sharma S, Ma J, Lemmens V, Van Looveren D, Arkalagud Javarappa MP, Boudewijns R, Malengier-Devlies B, Liesenborghs L, Kaptein SJF, De Keyser C, Bervoets L, Debaveye S, Rasulova M, Seldeslachts L, Li LH, Jansen S, Yakass MB, Verstrepen BE, Böszörményi KP, Kiemenyi-Kayere G, van Driel N, Quaye O, Zhang X, Ter Horst S, Mishra N, Deboutte W, Matthijnsens J, Coelmont L, Vandermeulen C, Heylen E, Vergote V, Schols D, Wang Z, Bogers W, Kuiken T, Verschoor E, Cawthorne C, Van Laere K, Opdenakker G, Vande Velde G, Weynand B, Teuwen DE, Matthys P, Neyts J, Jan Thibaut H, Dallmeier K. A single-dose live-attenuated YF17D-vectored SARS-CoV-2 vaccine candidate. *Nature.* 2021 Feb;590(7845):320-325.
20. Boudewijns R, Pérez P, Lázaro-Frías A, Van Looveren D, Vercruysse T, Thibaut HJ, Weynand B, Coelmont L, Neyts J, Astorgano D, Montenegro D, Puentes E, Rodríguez E, Dallmeier K, Esteban M, García-Arriaza J. MVA-CoV2-S Vaccine Candidate Neutralizes Distinct Variants of Concern and Protects Against SARS-CoV-2 Infection in Hamsters. *Front Immunol.* 2022 Mar 16;13:845969.
21. Mooij P, García-Arriaza J, Pérez P, Lázaro-Frías A, Verstrepen BE, Böszörményi KP, Mortier D, Fagrouch Z, Kiemenyi-Kayere G, Niphuis H, Acar RF, Meijer L, Stammes MA, Kondova I, Verschoor EJ, Geurts-vanKessel CH, de Bruin E, Sikkema RS, Luczkowiak J, Delgado R, Montenegro D, Puentes E, Rodríguez E, Bogers WMJM, Koopman G, Esteban M. Poxvirus MVA Expressing SARS-CoV-2 S Protein Induces Robust Immunity and Protects Rhesus Macaques From SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2022 Mar 16;13:845887.
22. Villadiego J, García-Arriaza J, Ramírez-Lorca R, García-Swinburn R, Cabello-Rivera D, Rosales-Nieves AE, Álvarez-Vergara MI, Cala-Fernández F, García-Roldán E, López-Ogáyar JL, Zamora C, Astorgano D, Albericio G, Pérez P, Muñoz-Cabello AM, Pascual A, Esteban M, López-Barneo J, Toledo-Aral JJ. Full protection from SARS-CoV-2 brain infection and damage in susceptible transgenic mice conferred by MVA-CoV2-S vaccine candidate. *Nature Neuroscience.* 2022 accepted.
23. Pérez P, Lázaro-Frías A, Zamora C, Sánchez-Cordón PJ, Astorgano D, Luczkowiak J, Delgado R, Casasnovas JM, Esteban M, García-Arriaza J. A Single Dose of an MVA Vaccine Expressing a Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spike Protein Neutralizes Variants of Concern and Protects Mice From a Lethal SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 2022 Jan 27;12:824728.
24. Pérez P, Astorgano D, Albericio G, Flores S, Sánchez-Cordón PJ, Luczkowiak J, Delgado R, Casasnovas JM, Esteban M, García-Arriaza J. Intranasal administration of a single dose of MVA-based vaccine candidates against COVID-19 induced local and systemic immune responses and protects mice from a lethal SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2022 Sep 12;13:995235.

Si desea citar nuestro artículo:

**La vacuna MVA-CoV2-S desarrollada en el CNB-CSIC es altamente inmunogénica y completamente eficaz frente al SARS-CoV-2/COVID-19: futuro y oportunidades**

Juan García-Arriaza y Mariano Esteban

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 415-426

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.08>

**The MVA-CoV2-S vaccine developed at the CNB-CSIC is highly immunogenic and completely effective against SARS-CoV-2/COVID-19: future and opportunities**

Juan García-Arriaza y Mariano Esteban

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 415-426



## LA LIBERTAD, EL DON SUPREMO... DE TODOS

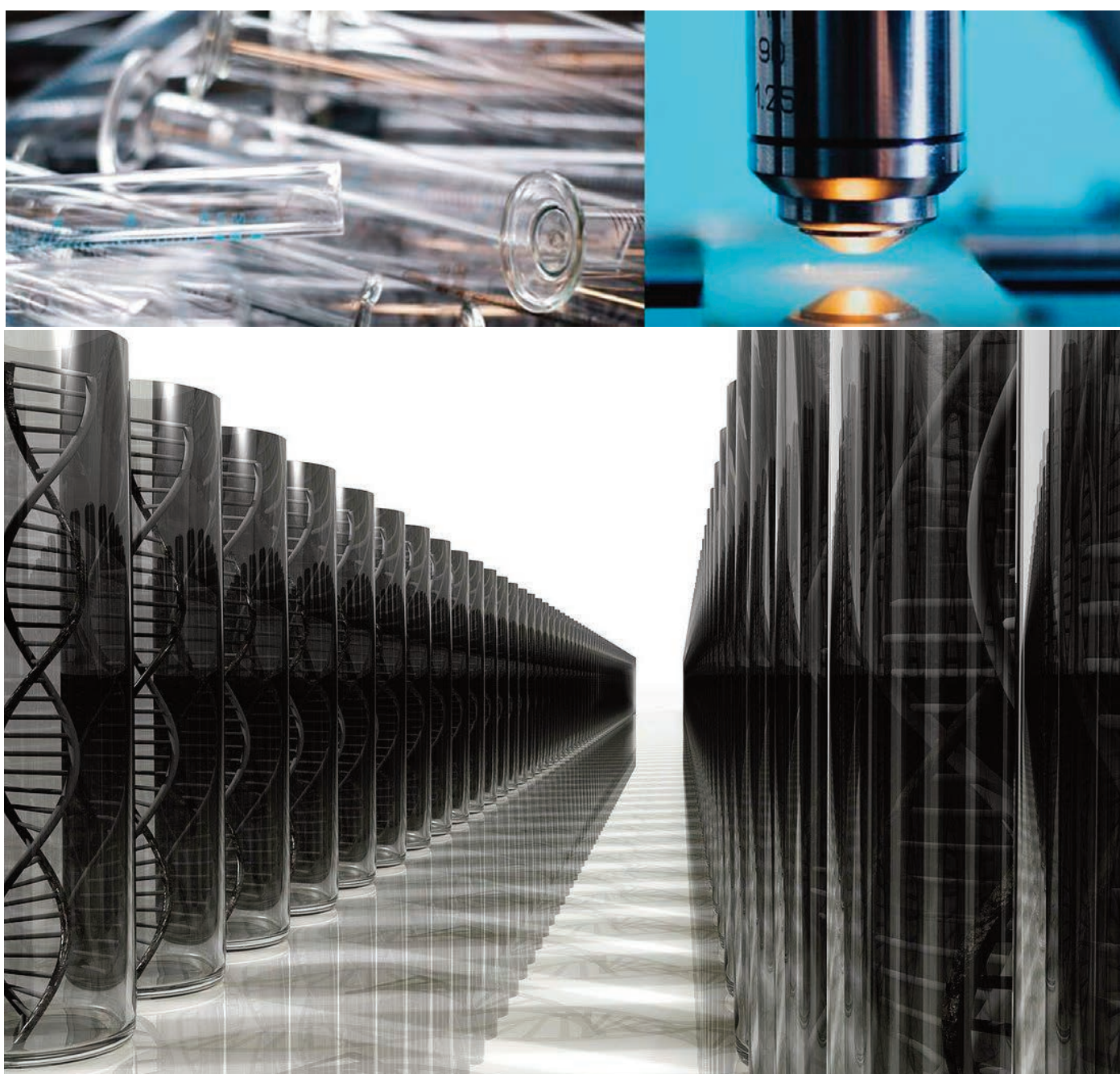
## FREEDOM, THE SUPREME GIFT... OF ALL

**Federico Mayor Zaragoza**

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** f.mayor@fmayor.e.telefonica.net

**ARTÍCULO DE OPINIÓN**





Cuanto más sé más esencial aparece la libertad sin cortapisas y menos aceptable el determinismo. La grandeza de la especie humana es la libertad.

Sí, la libertad es el don supremo. Al filo exacto de las certezas y de las incertidumbres, de las luces y de las sombras, decidir, elegir, imaginar... ¡crear! Cada ser humano único, investido de la facultad de discernir, de decidir en cada instante.

Defendamos siempre nuestra libertad. No nos dejemos someter. Subrepticamente, se está pasando del sueño de la liberación al de la prosperidad.

Las parcelas de autonomía personal van reduciéndose: en términos económicos (tarjetas de crédito, nóminas depositadas...); en el ámbito de la comunicación y la localización, por la telefonía móvil; modificaciones relevantes en la transparencia y la protección de la vida privada, debido a que los actuales mecanismos de confidencialidad están siendo manifiestamente superados por los *big data*; ... hasta la libertad de pensamiento se halla progresivamente modulada por el inmenso poder mediático y de información que origina sin cesar estereotipos y promueve iconos que poco a poco se van adoptando...

No hay nada más antihumano que el fanatismo, que la trágica ofuscación que producen los dogmas, antítesis de la libertad, como lastre de las alas para el vuelo sin límites en el espacio infinito del espíritu. Incardinado en estructuras temporales y putrescibles, cada ser humano es capaz de crear, de decidir por sí mismo, de ser *plenamente* humano.

La libertad humana, única condición en los designios de la creación. Todo es predecible en el universo, todo regulado por inmutables leyes físicas y químicas... salvo la discrecionalidad humana. La dignidad humana se basa, precisamente, en el distintivo y exclusivo poder de enfrentarse sin cortapisas a las preguntas esenciales.

Esta es la grandeza de la especie humana, y es por esta razón que la Constitución de la Unesco establece que la educación consiste en contribuir a formar personas "libres y responsables". Cada uno, despojado de adherencias y prejuicios, actuando en virtud de las propias reflexiones y nunca al dictado de nadie.

En diciembre de 1990 escribí: "Ir a Tu encuentro/ cada noche/ sin hallarTe! Aquí reside la más alta facultad/ que nos Has dado:/ vivir en libertad/ merodeando interrogantes/ y certezas/ hasta que un día, al fin, / sepamos./ Hoy, sólo Tus huellas". Huellas que constituyen una lección inmarcesible de amor. Frente al poder absoluto, el amor. Frente a la opción de la fuerza y la exclusión, el amor. Constituye un indeleble mensaje histórico de dignidad compartida con toda la humanidad, dando la fórmula de la vida digna: ... "al prójimo como a tí mismo". Por eso me gusta destacar la im-

portancia de que en algunas lenguas -castellano, catalán- el plural del "yo" sea "nos-otros", porque "el otro", "los otros", constituyen una faceta indisoluble de ser plenamente, del humanismo sin fisuras.

Hay que mantener a toda costa la diversidad frente a la uniformización, la unicidad capaz de anticiparse e inventar el futuro, propio de *cada* ser humano.

Esta es la razón de que en el título haya añadido "de todos" a "libertad, el don supremo". Libertad propia y ajena. Con mi libertad no puedo limitar la del prójimo. Por lo tanto, nadie puede negarse a ser vacunado siendo contaminante y es que el derecho a la salud es esencial.

Es necesario, especialmente en un momento en que los peligros que se ciernen sobre la humanidad son globales y algunos irreversibles, observar el rigor científico y condicionar las decisiones en temas fundamentales al conocimiento. La Comunidad Científica debe hallarse siempre junto al poder pero nunca sometida a él. Saber: esto es lo realmente importante. La ciencia no debe nunca dejarse influir por la ideología. Tampoco la justicia. Es un escándalo que se acepte que unos jueces sean "conservadores" y otros "progresistas". En ambos casos son malos jueces. La independencia de la justicia se representa por una balanza en la que los platillos se hallan al mismo nivel exacto. El juez debe aplicar la ley y, si cree que algunos aspectos deben mejorarse puede proponerlo a los órganos legislativos. Lo mismo sucede con los científicos: pueden ser de "izquierdas" o de "derechas" social y políticamente pero es esencial que los criterios personales no deformen su actuación.

En 1945, en un diseño realmente impecable del multilateralismo democrático, el Presidente Roosevelt estableció las Naciones Unidas, cuya Carta se inicia así: "Nosotros, los pueblos... hemos resuelto evitar a las generaciones venideras el horror de la guerra". Pero era en aquel momento prematuro porque "los pueblos" no existían. Hasta hace unos años, la discriminación por razón de género, ideología, etnia, creencia... era prácticamente total y la gran mayoría de la humanidad, sometida siempre a un poder absoluto masculino, nacía, vivía y moría, en unos kilómetros cuadrados. "Los pueblos" carecían de voz. Hoy, y ésta es la gran esperanza, quizás la única de los tiempos que vivimos, ya podemos expresarnos libremente gracias a la tecnología digital, y se han hecho grandes progresos en el reconocimiento de la igual dignidad humana.

Ahora, cada ser humano único, capaz de crear, capaz de expresarse, ya puede decidir evitar a las generaciones que llegan a un paso de la nuestra el horror de la guerra. Ahora ya podemos sustituir el terrible adagio "si quieres la paz, prepara la guerra" por el de "si quieres la paz, prepara la palabra".





Para ser libres tenemos que ser actores y no espectadores de lo que acontece. Los medios de comunicación, las redes sociales... , son de tanta envergadura que requieren que la ciudadanía, consciente de sus responsabilidades, actúe y participe.

Ahora, por fin, un multilateralismo democrático podría sustituir la gobernanza supremacista y plutocrática que durante las últimas décadas ha prevalecido. Ahora, por fin, cada ser humano, "libre y responsable" como define lúcidamente la Constitución de la UNESCO a los educados, puede participar en la reconducción de las actuales tendencias.

Sí: libertad, el don supremo de todos. Su pleno ejercicio en un contexto democrático es la mejor previsión del futuro que anhelamos.

Si desea citar nuestro artículo:

**La Libertad. El don supremo... de todos**

Federico Mayor Zaragoza

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 427-429

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.09>



# ANTIGUOS Y NUEVOS PARADIGMAS EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## OLD AND NEW PARADIGMS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

**José Miguel Ortiz Melón**

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Profesor Emérito de la Universidad de Cantabria

**corresponding author:** ortizjm@unican.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

Los principios de la Bioquímica están ligados históricamente a los estudios sobre la fermentación y al papel de las enzimas en este proceso. En las células tienen lugar miles de reacciones catalizadas por enzimas que son responsables de los fenómenos vitales. En etapas posteriores se ha puesto de manifiesto que estas reacciones transcurren de manera organizada y regulada en el espacio intracelular. Mas adelante, algunos procesos bioquímicos como la duplicación de DNA y la expresión genética han revelado el papel de la información en las reacciones bioquímicas. La identificación de módulos lógicos y circuitos por los que transcurre esta información constituye una nueva etapa. Junto a esta aproximación reduccionista, avances recientes en secuenciación genómica, bioinformática, proteómica y experimentación de alto rendimiento, tratan de proporcionar un conocimiento integral de sistemas biológicos complejos.

#### ABSTRACT

*The principles of biochemistry are historically linked to studies on fermentation and the role of enzymes in this process. Thousands of reactions catalyzed by enzymes that are responsible for vital phenomena take place in cells. In later stages it has been shown that these reactions take place in an organized and regulated manner in the intracellular space. Later, biochemical processes such as DNA duplication and gene expression have revealed the role of information in biochemical reactions. The identification of logic modules and circuits through which this information passes is a new stage. Alongside this reductionist approach, recent advances in genomic sequencing, bioinformatics, proteomics, and high-throughput experimentation seek to provide comprehensive knowledge of complex biological systems.*

#### Palabras Clave:

bioquímica  
historia  
paradigmas  
biología de sistemas

#### Keywords:

biochemistry  
history  
paradigms  
systems biology



## 1. VITALISMO Y BIOQUÍMICA

Hasta la mitad del siglo XIX muchos biólogos creían que los fenómenos vitales característicos de los seres vivos eran debidos a fuerzas especiales distintas de las de la Física y la Química. Estas fuerzas se denominaron “fuerza vital” y se pensaba que solo estaba presente en los organismos vivos. Las ideas del vitalismo pueden parecernos extrañas en la actualidad, pero los científicos de entonces habrían encontrado muy difícil explicar las actividades que tienen lugar en los seres vivos, solamente en términos de fuerzas físicas y químicas.

La idea de que muchas de las actividades de la vida pueden ser entendida en términos de química tiene sus orígenes en los estudios de la fermentación. Antoine Lavoisier (1743-1794) fue uno de los fundadores de la Química moderna, y se interesó entre otras cosas en la fermentación, una práctica empleada desde tiempos remotos por la que algunas frutas fermentan y producen alcohol. Observando que el principal componente del jugo de uva era azúcar y que el principal producto de la fermentación era etanol Lavoisier propuso que “la fermentación era una reacción química en la que el azúcar del jugo de la uva se convertía en el etanol del vino producido”. Investigando más mostró que el “fermento” presente durante la fermentación, era el elemento que jugaba un papel clave en la reacción química. Ahora bien, si se sustituía el jugo de uva por glucosa y se añadía una pequeña cantidad de fermento se producía también etanol, igual que durante una fermentación normal. Exactamente lo que hacía el fermento no estaba claro entonces, aunque un poco más tarde, Theodor Schawn el famoso autor de la teoría celular y otros, especulaban ya con que el fermento era la levadura.

La claridad llegó un cuarto de siglo después con el trabajo de Louis Pasteur, el gran científico francés. Solicitado por la industria del vino para investigar porqué algunas veces las fermentaciones se estropeaban, mostró que en algunos casos la fermentación producía ácido láctico en lugar de etanol. El examen microscópico de los sedimentos de las vasijas de fermentación reveló que las que producían etanol contenían levaduras, en tanto que las que daban lugar a ácido láctico contenían otro microorganismo, en lugar de levadura. Pasteur propuso entonces que la vida microbiana de la levadura era la responsable de la producción de etanol y que el otro microorganismo era el que producía ácido láctico. El aspecto más importante para la Biología de este descubrimiento fue la conclusión de que el crecimiento de una célula viva daba lugar a la producción de una sustancia química. Esto llevo a Pasteur a concluir que “las reacciones químicas son la expresión de la vida de las células”. Para confirmar esta idea Pasteur inoculó sedimentos de ambos tipos de vasijas en botellas que contenían azúcares y demostró que las levaduras producían etanol y el otro microorganismo, ácido láctico.

Estos experimentos y el estudio de otras fermentaciones le llevaron a proponer más adelante que las reacciones químicas eran “actos fisiológicos” que daban lugar a múltiples productos, los cuales eran necesarios para las células.

El siguiente avance, fue la demostración de que las células vivas contenían sustancias que podían llevar a cabo reacciones químicas análogas a las que se producían durante la fermentación. Así, algo más tarde, el también científico francés Berthelot (1827-1907), tras triturar células de levaduras obtuvo un extracto soluble que purificado y separado de las células fue capaz de hidrolizar el azúcar sacarosa en sus componentes glucosa y fructosa. La sustancia responsable de esta actividad la denominó *invertasa* y concluyó, que las células no eran necesarias para que las reacciones químicas de la fermentación tuvieran lugar sino que contenían sustancias que eran “activas” por sí mismas y que estas podían llevar a cabo la fermentación aunque las células de las que procedían no estuvieran presentes.

Aproximadamente 30 años más tarde, al principio del siglo XX, estas observaciones fueron continuadas por dos hermanos alemanes, Hans y Eduard Buchner, los cuales extrajeron de las células de levadura un enzima que resultó ser responsable de las reacciones químicas. Los Buchner llevaron a cabo la rotura de células de levadura moliéndolas en un mortero y filtrando después los restos celulares para obtener un extracto celular. Este extracto era capaz de fermentar azúcares y producir alcohol demostrando que dicha reacción química podía tener lugar “*in vitro*”. El trabajo de los Buchner permitió concluir que las células de levadura contenían una sustancia, llamada *zymasa* (un enzima) y que esta sustancia era la responsable de la reacción química que convertía el azúcar en alcohol.

Se puede decir que los resultados anteriores formaron la piedra angular de la Bioquímica. Mostraron que la fermentación, un fenómeno asociado con la vida, podía ser reducida a reacciones químicas catalizadas por sustancias intracelulares llamadas enzimas.

## 2. DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS A SU REGULACIÓN Y ORGANIZACIÓN EN LAS CÉLULAS

Generalizando a partir de estos resultados se puede decir que la mayoría de las actividades de las células están basadas en reacciones químicas catalizadas por enzimas. La Bioquímica ha confirmado este punto de vista en numerosas ocasiones. Se ha llegado a establecer, que dentro de las células tienen lugar miles de reacciones químicas que operan de manera simultánea, y que éstas, son responsables de los fenómenos vitales característicos de los organismos vivos. Esta multitud de reacciones, son llevadas a cabo por



una gran variedad de enzimas, cada una de las cuales, requiere un microambiente específico para llevar a cabo su función. Los diferentes microambientes están caracterizados por propiedades tales como, el pH, la concentración iónica, la disponibilidad de sustratos, etc.

Para trabajar de manera efectiva los microambientes necesitan estar separados unos de otros y las células utilizan una serie de mecanismos para llevar a cabo dicha separación. Al nivel más simple la superficie de los enzimas proporciona espacios que permiten un cierto aislamiento del ambiente local. Si los enzimas se combinan entre sí se generan complejos enzimáticos que presentan mejores oportunidades para conseguir el microambiente apropiado. Esto ha dado lugar a la canalización de sustratos y productos desde un enzima al siguiente a través de una serie ordenada de reacciones que constituyen las llamadas "rutas metabólicas".

Los complejos de enzimas pueden llegar a formar verdaderas máquinas moleculares como los ribosomas, responsables de la síntesis de proteínas. A nivel superior, orgánulos subcelulares rodeados de membranas como el núcleo, las mitocondrias, cloroplastos etc, proporcionan una mayor posibilidad de generar compartimentos. Finalmente, la célula entera rodeada por una membrana separa el contenido celular total del mundo externo. Esta variedad de microambientes organizados da lugar a la compleja estructura de la célula y permite entender los procesos vitales a nivel celular.

Otro mecanismo usado para separar microambientes es utilizar cambios de la célula en el tiempo. Esto se pone de manifiesto durante el ciclo celular cuando los cambios tienen lugar en el ambiente local de los cromosomas. Así durante la mitosis, los cromosomas situados en el núcleo se condensan y tras la rotura de la membrana nuclear se liberan en el citoplasma para permitir que tenga lugar la separación de las cromátidas. Posteriormente, los cromosomas se descondensan y se confinan de nuevo en el núcleo para permitir que los enzimas de la síntesis de DNA (DNA polimerasas) operen durante la siguiente fase del ciclo. El DNA puede así asociarse con diferentes microambientes químicos.

Gracias a estos y otros paradigmas, los bioquímicos, convertidos en biólogos moleculares comparten desde hace tiempo la idea de que los fenómenos de la vida pueden ser entendidos en términos de Química.

Es importante entender que se trata de una forma de química altamente organizada.

Los miles de reacciones químicas intracelulares deben estar no solo ordenadas sino también reguladas para alcanzar una buena organización en las células

Un fisiólogo americano, Jaques Loeb, postuló ya en 1912 que la célula debía ser considerada como una máquina química y hay dos características de las máquinas importantes para entender

esta comparación. La primera es conocer cómo están reguladas las reacciones químicas y la segunda, cómo se comunican unas con otras.

Respecto a la regulación de las reacciones enzimáticas, se ha utilizado en ocasiones la analogía con una máquina de vapor y mas en concreto, con una pieza de la misma llamada regulador que regula el flujo de vapor. El regulador se compone de dos bolas que giran alrededor de un eje. A medida que la máquina va más deprisa, las bolas se disponen horizontalmente por la fuerza centrífuga y automáticamente, reducen el flujo de vapor que va hacia la máquina desde la caldera con lo que se reduce su velocidad. Esta regulación hacia atrás (feedback) opera también en las células regulando el flujo a través de las rutas metabólicas. De este modo, los productos de una secuencia de reacciones enzimáticas cuando se acumulan regulan etapas tempranas de la ruta, actuando como inhibidores de las actividades de enzimas situadas al principio de la ruta, y reduciendo el flujo a través de ella. Es lo que se conoce como un bucle de retroalimentación.

Otro ejemplo de regulación es el que tiene lugar en los controles de edición que operan durante la síntesis de proteínas y la replicación de DNA. En estos casos, hay mecanismos de control que miden la fuerza de interacciones químicas. Así, durante la síntesis de proteínas, la interacción entre el codón en el mRNA y el anticodón en el tRNA es medida cuidadosamente y si la interacción es débil, porque el tRNA unido no es el correcto, este es rechazado. La regulación permite así que las reacciones químicas celulares puedan trabajar conjuntamente y generar un comportamiento que funciona con una lógica de eficiencia y economía celular.

Los ejemplos anteriores permiten entender el funcionamiento de la regulación en la vecindad de las reacciones químicas intracelulares pero además de una regulación local, se necesitan regulaciones de mayor alcance entre los diferentes microambientes y espacios intracelulares. Es necesario entonces, considerar mecanismos de señalización a distancia para asegurar la comunicación mientras se mantiene la separación. Se ha llegado a conocer, y nos hemos llegado a familiarizar con la existencia de las llamadas rutas de transducción de señal que forman parte de procesos de intercomunicación entre células, como la regulación hormonal, y también con procesos de señalización intracelular, menos conocidos, pero igualmente necesarios para que las actividades de la célula estén reguladas y coordinadas de manera apropiada. Hay también mecanismos de transporte que llevan sustancias químicas y componentes de un lugar a otro.

Por otra parte, del mismo modo que es necesario la señalización en el espacio hay también necesidad de una señalización en el tiempo, entre las diferentes etapas de la vida celular. Así, durante el ciclo celular, los sucesos que tienen lugar en el principio de



la vida de una nueva célula son recordados y comunicados a otros sucesos más avanzados en el ciclo. Por ejemplo, si la replicación de DNA es incompleta, por errores en este proceso, es importante comunicar la situación a los mecanismos que llevan a cabo la siguiente etapa, la mitosis, para que la célula no intente dividirse hasta que se haya completado toda la replicación de DNA. Esto tiene lugar a través de vías de señalización. Se pueden encontrar ejemplos similares en los complejos procesos de diferenciación celular y el desarrollo de un organismo.

### 3. LA INFORMACIÓN EN LAS BIOMOLÉCULAS Y SU TRANSFERENCIA EN LOS PROCESOS BIOQUÍMICOS

Como he mencionado anteriormente las células muestran una amplia variedad de comportamientos encaminados a un propósito, una característica de la vida que J. Monod, el científico y premio Nobel francés llamó "teleonomía". Estas funciones incluyen la capacidad de comunicación para llevar a cabo lo homeostasis, la capacidad de adaptación a estímulos externos, la de reproducirse, y así sucesivamente. De modo, que una manera de considerar la organización biológica es considerarla como una organización que tiene un comportamiento dirigido esto es un propósito.

Esta idea trataría de explicar la organización biológica y las reacciones bioquímicas en términos de procesos lógicos e informativos que operan en las células a la manera a como lo hacen los circuitos en un ordenador.

Dos ejemplos ilustran esta idea, el significado de la estructura del DNA para la herencia y la regulación genética. En cuanto al primero, la doble hélice de DNA como descubrieron Watson y Crick está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos, y la asociación entre las cadenas depende de las reglas del apareamiento de las bases. Esta estructura de doble hélice es muy importante en los procesos de codificación de genes y de replicación del DNA. Sabiendo que los genes están constituidos por DNA y que contienen información, hay que destacar la capacidad de la secuencia de nucleótidos para almacenar información. Esta se encuentra en el orden y tipo de nucleótidos que constituyen la secuencia lineal de una cadena de DNA, de manera similar a cómo las letras forman las palabras y las frases. La secuencia de DNA de un gen es transcrita entonces en RNA, y esta a su vez, es traducida en la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por un gen.

La replicación de DNA tiene lugar por separación de las cadenas de nucleótidos utilizando las reglas del apareamiento de bases para construir nuevas cadenas complementarias. De este modo, el significado biológico que subyace en la capacidad codificadora y replicativa del DNA puede ser entendida en términos de información codificada en la estructura del DNA y el flujo de información que va de la secuencia del gen a la función de la proteína.

La comprensión de la organización biológica que da lugar a la herencia viene así de transformar la bioquímica de estos procesos en cómo la información es comunicada y procesada.

El segundo ejemplo se refiere a la regulación genética. El conocimiento bioquímico de este proceso, ha conducido a la identificación y caracterización de proteínas represoras y activadoras que se unen a regiones específicas del DNA situadas antes y después del gen, o en su proximidad, y que conducen a cambios a nivel de la expresión del gen. Sin embargo, para generar el entendimiento biológico de este proceso, estas descripciones necesitan ser transformadas en estructuras lógicas, en los genes que son objeto de regulación. Un ejemplo de esto son los bucles de retroalimentación que regulan la transcripción genética, como mostraron Jacob y Monod en la regulación de los genes del operón lactosa en *Escherichia coli*. Así pues, si la organización biológica puede ser entendida en términos de procesos lógicos e informativos generados por los mecanismos bioquímicos implicados en la replicación de DNA y en la expresión genética la siguiente cuestión es si esta nueva aproximación puede permitir entender otros aspectos de la biología celular. Se trataría entonces, de identificar los módulos lógicos e informativos que operan en las células en cada caso, y que derivan de los procesos bioquímicos, moleculares y biofísicos que tienen lugar en ellas. Veamos el caso las rutas de señalización. La complejidad potencial de las rutas de señalización es considerable. Las conexiones entre las diferentes partes de una red pueden incluir bucles de retroalimentación positivos, negativos y mixtos que alimentan hacia delante y hacia atrás secuencias de señalización.

El sistema de control del ciclo celular por ejemplo contiene múltiples bucles de retroalimentación. Los llamados puntos de control del ciclo celular (checkpoints) se pueden considerar como un tipo de circuito de retroalimentación negativa para su regulación. Por ejemplo, en la mitosis, cuando se detectan cinetocoros, en el centrómero de los cromosomas, no unidos a microtúbulos se activa el sistema de regulación conocido como el control del ensamblaje del huso (SAC). Este punto de control detiene la progresión de la mitosis y permite a la célula un tiempo adicional para que los cinetocoros libres se unan a los microtúbulos que les correspondan. Por lo tanto, los cinetocoros desocupados activan una ruta de señalización que retroalimenta una secuencia de reacciones para disminuir el número de cinetocoros desocupados, es decir un circuito de retroalimentación negativa.

Los modelos de circuitos de retroalimentación positiva por otro lado pueden comportarse en una variedad de formas diferentes. Un circuito de este tipo, puede amplificar señales en respuesta a una pequeña concentración de moléculas de entrada, dando lugar a una mayor concentración de moléculas de salida. Actúa entonces como un amplificador y convierte un pequeño cambio de entrada en un gran cambio de salida. La retroalimentación positiva permite



también la generación de las denominadas ondas de actividad. Estudios en extractos de ovocitos de *Xenopus* han demostrado que el estado mitótico se propaga por ondas de actividad rápidas.

Las ondas de actividad pueden ser un mecanismo para coordinar eventos a grandes distancias. Ejemplos conocidos son los potenciales de acción en la transmisión del impulso nervioso y las ondas de calcio. En el sistema de señalización por ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , los periodos de una señal oscilante, añaden una propiedad importante, la dinámica, una forma de canalizar más información que una simple señal de inicio o paro de una secuencia de reacciones.

En las células musculares la transmisión de señal puede ser conducida por una red de nanotubos de carbono semejante a lo que se encuentra en el microprocesador de un ordenador. De este modo, la información codificada en forma de moléculas cargadas es conducida a diversas partes de la célula de manera semejante a como la corriente eléctrica es conducida por circuitos en la placa base de un ordenador a las distintas partes que lo componen. Estas señales son responsables del comportamiento celular como cuando un músculo se relaja o se contrae. Lo más sorprendente, es que los circuitos celulares en este sistema, parecen ser más flexibles que los electrónicos y se reconfiguran para producir diferentes respuestas según la información recibida, constituyendo una verdadera "cell wide web".

#### 4. DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA BIOLOGÍA DE SISTEMAS

El gran desafío de la biología molecular es desentrañar la organización y las interacciones de las redes celulares que permiten procesos complejos. La complejidad surge de la existencia de interacciones no lineales y dinámicas entrelazadas entre un gran número de constituyentes celulares, como genes, proteínas, metabolitos, etc. El enfoque reduccionista ha permitido en muchos casos la identificación de la mayoría de los componentes e interacciones, pero no ofrece conceptos y métodos convincentes para comprender cómo pueden surgir las propiedades del sistema. Para comprender cómo y por qué las células funcionan de la forma en que lo hacen, se requieren datos cuantitativos sobre las concentraciones de los componentes para cuantificar las interacciones. Una perspectiva completa de todo el sistema conocida como Biología de Sistemas es necesaria para que las propiedades de la red pueda entenderse cuantitativamente y ser incluso alterada a conveniencia.

Las claves en este nuevo paradigma están asociadas con avances en las llamadas tecnologías de alto rendimiento que caracterizan a las *ómicas* (genómica, proteómica, metabolómica, etc). Con respecto a la genómica, las técnicas de secuenciación han experimentado un desarrollo tal que se puede ahora llevar a cabo la secuenciación de genomas completos de manera totalmente automatizada. Los instrumentos de procesamiento combinados con

capacidades de alto rendimiento están disponibles en muchos laboratorios de investigación. La secuenciación de un genoma de una célula se puede completar en horas o días. El análisis de los datos de secuenciación se ha visto facilitado con la ayuda de la bioinformática, que integra técnicas de diferentes disciplinas, como informática y matemáticas, para interpretar datos biológicos. La bioinformática no solo ayuda en la anotación del genoma sino que también proporciona información sobre las funciones de proteínas y homologías entre especies.

La información obtenida de la genética se puede entender con mayor precisión si damos un paso más allá al nivel transcripcional. Mediante la cuantificación del nivel de expresión de genes en diferentes condiciones, se han desarrollado matrices de ARN para facilitar la interpretación de la función del genoma y los patrones de regulación.

La técnica, llamada RNA-Seq permite la secuenciación directa de las transcripciones de ARN con resolución de una sola base. Más importante aún, proporciona una poderosa herramienta para comprender la dinámica transcriptómica al monitorizar los niveles de expresión génica.

Las proteínas por otra parte están presentes en todos los sistemas biológicos; su compleja estructura les permite realizar innumerables funciones, como transporte, catálisis, señalización y regulación. Los estudios experimentales de proteínas dependen en gran medida de tecnologías e instrumentación proteómica. Poderosas técnicas proteómicas pueden detectar pequeñas cantidades de una proteína específica y métodos de alto rendimiento como los que permiten analizar por ejemplo todas las fosfatasa y quinasas en el proteoma de *E.coli*.

Mientras que la Biología de Sistemas proporciona información sobre la estructura y función de proteínas naturales, la Biología sintética, conduce al diseño de proteínas que realizan funciones novedosas. Una aproximación es diseñar proteínas basadas en la modularidad. Las proteínas, se pueden desglosar en módulos: partes discretas de las mismas que realizan una función específica. Los módulos pueden unirse a ligandos, transmitir información, catalizar una reacción o realizar otras muchas tareas. Por ejemplo, hay dominios de unión que median interacciones proteína-péptido mediante el reconocimiento de ciertas características peptídicas, como el dominio SH3 que reconoce secuencias ricas en prolina y el dominio PDZ que reconoce secuencias C-terminales.

La metabolómica por otro lado, se centra en el perfil y la dinámica de los metabolitos, y también revela la actividad de las reacciones enzimáticas celulares como las vías anabólicas y catabólicas. Metodologías de identificación y cuantificación de metabolitos basadas en cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) se han desarrollado en las últi-

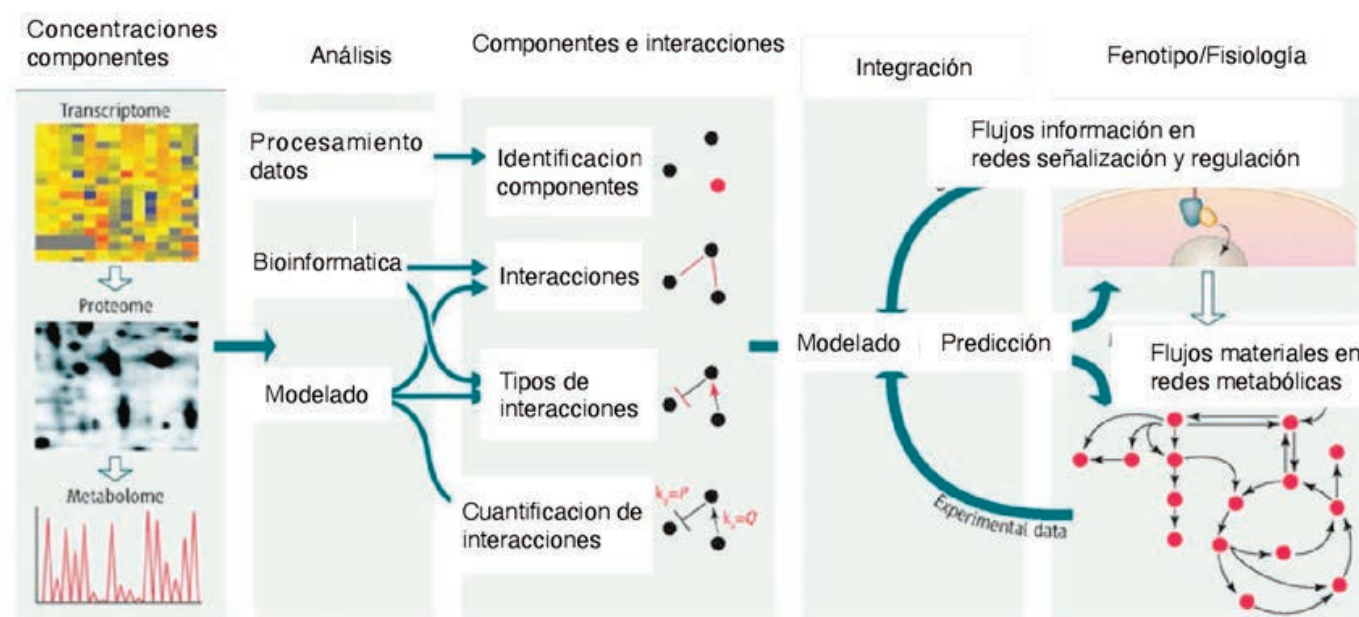


Figura 1. Mapa de procesos en Biología de Sistemas

mas décadas para estudiar perfiles y dinámicas de metabolitos. Además, se han desarrollado herramientas de modelado metabólico, como el análisis de balance de flujo (FBA) y análisis de flujo metabólico (FMA).

La combinación de metodologías analíticas metabólicas y herramientas de modelado ayuda a caracterizar redes metabólicas, identificar nuevas vías metabólicas y estudiar la respuesta de flujo metabólico a modificaciones genéticas o bajo diversas condiciones ambientales. Guiada por el conocimiento de la Biología de Sistemas, la Biología sintética tiene como objetivo diseñar la metabolómica, dirigiendo el flujo de metabolitos a rutas deseables. Esto incluye la construcción de nuevas rutas biosintéticas para la producción de moléculas e ingeniería de rutas de biodegradación para aplicaciones ambientales.

Mediante toda esta tecnología, la Biología molecular de Sistemas, opera mediante un conocimiento integral de las concentraciones de los componentes de un sistema para a partir de ellas inferir interacciones entre los componentes utilizando métodos computacionales. El objeto de los métodos de modelado computacional es predecir el estado de la red funcional a partir de las concentraciones e inferir los procesos de información que controla dicho estado (Fig.1).

## 5. REFERENCIAS

1. Allen G. Life science in the twentieth century. Cambridge: Cambridge University Press, 1978.
2. Judson, H.F. The eighth day of creation. Makers of the revolution. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
3. Dressler D, Potter H. Discovering enzymes. New York: Scientific American Library, 1991.

4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M et al. Molecular biology of the cell. New York: Garland, 2002.
5. Monod J. Chance and necessity. London: Collins, 1972.
6. Jacob F. The logic of living systems. A history of heredity. London: Penguin, 1974.
7. Nurse P. Understanding cells. Nature 2003; 424:883.
8. Morgan, D.O. The Cell Cycle: Principles of Control. London UK: New Science Press Ltd; 2007.
9. Ferrell JE Jr, Tsai TY, Yang Q. Modeling the cell cycle: why do certain circuits oscillate? Cell. 2011; 144:874–885.
10. Thomas R. On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations. Springer Ser Synergetics. 1981; 9:180–193.
11. Trunnell NB, Poon AC, Kim SY, Ferrell JE Jr. Ultrasensitivity in the regulation of Cdc25C by Cdk1. Mol Cell. 2011; 41:263–274.
12. Duan J, Navarro-Dorado J, Clark J, Kinnear N, Meinke P, Schirmer E, Evans A. The cell-wide web coordinates cellular processes by directing site-specific  $\text{Ca}^{2+}$  flux across cytoplasmic nanocourses. Nature Comm. 10:2299 (2019)
13. Sauer U, Heinemann M, Zamboni N. Getting closer to the whole picture. Science 2007; 316, 550.

Si desea citar nuestro artículo:

**Antiguos y nuevos paradigmas en Bioquímica y Biología molecular**

José Miguel Ortiz Melón

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 431-436

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.10>

# INTRODUCCIÓN AL HUMANISMO Y AL TRANSHUMANISMO

## INTRODUCTION TO HUMANISM AND TRANSHUMANISM

**Rafael Sentandreu Ramón**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Profesor Emérito de la Universidad de Valencia

**corresponding author:** rafael.sentandreu@uv.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

En el presente ensayo se muestran las diferencias que existen entre la filosofía de los humanistas y el transhumanismo. La primera pretende dar una visión integral del hombre contemplado desde un punto de vista racional y ético, resaltando su posición central en el universo y su incidencia en otros seres vivos y en el cambio climático.

El transhumanismo se centra específicamente en la optimización del *Homo sapiens*, y pretende su perfeccionamiento mediante un programa técnico-científico (desarrollo de ciborgs y cambios genéticos) conducente a alumbrar a una nueva especie biológica más capacitada para adaptarse al medio en que se encuentra.

#### ABSTRACT

*This essay shows the differences between the philosophy of humanists and transhumanism. The first aims to give a comprehensive view of man seen from a rational and ethical point of view, highlighting his central position in the universe and its impact on other living beings and climate change.*

*Transhumanism focuses specifically on the optimization of *Homo sapiens*, and aims to perfect it through a technical-scientific program (development of cyborgs and genetic changes) leading to the birth of a new biological species more capable of adapting to the environment in which it finds itself.*

#### Palabras Clave:

humanismo  
transhumanismo  
robot  
bioética

#### Keywords:

humanism  
transhumanism  
robot  
bioethics

## 1. INTRODUCCIÓN

El Humanismo es un movimiento científico y filosófico que intenta dar una visión integral del hombre a partir de un enfoque laico y conforme a posturas secularistas (1).

Propone conocer todas las características del *Homo sapiens* (sensibilidad, inteligencia, potencia física, etc.), interpretarlas desde un punto de vista racional y desde un prisma ético, reconociéndole como centro del universo. El pensamiento humanista prioriza al ser humano frente al pensamiento teísta, propugna una transformación radical en la forma de pensar, de investigar y propone modificaciones en el comportamiento del hombre en beneficio de toda la comunidad humana, con el objetivo, en particular, hacer frente al cambio climático.

El transhumanismo se centra exclusivamente en el *Homo sapiens* y pretende la superación de sus limitaciones tanto físicas como psíquicas, mediante la ciencia y los avances tecnológicos y contempla la modificación de su genoma y a la creación de una nueva especie biológica (2).

## 2. HUMANISMO

Su origen se remonta en las ideas de algunos filósofos griegos clásicos como Sócrates, los estoicos y los epicúreos, así como de diversas escuelas esotéricas chinas (como I Ching, que es un método de sabiduría que permite orientar nuestras decisiones cotidianas) y del movimiento lokaiata en la India clásica. Estas doctrinas filosóficas fueron censuradas por la Iglesia Católica durante la Edad Media dado que de acuerdo con ellas el hombre debía buscar en sí mismo, y no en un Dios, la solución a sus problemas.

El humanismo apareció como tal en el Renacimiento (siglos del XIV al XVI) y entre sus principales representantes se encuentran: Tomás Moro, escritor y jurista inglés, conocido por su obra «Utopía», Nicolás Copérnico, astrónomo y autor del heliocentrismo, que demostró que los planetas se mueven alrededor del Sol, en contra de lo establecido en su época y Erasmo de Rotterdam que buscó renovar la iglesia y la sociedad mediante un programa ético y cultural del ser humano.

Durante la Ilustración (siglo XVIII) con el desarrollo de la ciencia, los filósofos y científicos mantuvieron que la verdad debía conocerse sobre la base de la lógica y la razón en lugar de la autoridad, la revelación o dogma. Entre muchos otros Voltaire, Diderot y David Hume representaron a esta corriente.

En el siglo XIX los aportes de intelectuales como Mark Twain, Robert G. Ingersoll y Friedrich Nietzsche contribuyeron a fortalecer la idea de un sistema de creencias éticas y morales específicas de *Homo sapiens*.

### 2.1. El Manifiesto humanista 1

En 1933 se redactó el *Manifiesto humanista 1*, llamado así para distinguirlo de los *Manifiestos Humanistas* posteriores, y que fue avalado por 34 humanistas estadounidenses. A diferencia que sucede en esos otros, este primer *Manifiesto* se habla de una nueva religión y se alude al humanismo como “la religión del futuro”. Así mismo se reflexiona en él sobre los retos de la época y se recomienda en primer lugar, una forma de humanismo religioso no teísta como alternativa a las religiones de la época, y, en segundo lugar, una planificación nacional de índole económica y social (3).



Figura 1. El Humano feliz (*Happy Human*) es un icono que se ha adoptado como símbolo internacional del humanismo secular



## 2.2. El *Manifiesto humanista II*

Fue publicado en 1973 para afrontar los retos que se habían planteado en la escena mundial desde la publicación del primero: el auge del fascismo y su derrota en la Segunda Guerra Mundial, el crecimiento de la influencia y poder del marxismo-leninismo y del maoísmo, la amenaza del capitalismo y la Guerra Fría, la recuperación económica posbélica de Europa y América, la descolonización de amplias áreas del mundo, la creación de las Naciones Unidas, la revolución sexual, el desarrollo de los movimientos de mujeres, la demanda de las minorías de la igualdad de derechos, y la emergencia del poder estudiantil en los campus. Fue suscrito por muchos líderes del pensamiento y de la acción a lo largo y ancho del mundo: Julian Huxley (primer Presidente de la Unesco), Sidney Hook, Betty Friedan, Gunnar Myrdal, Jacques Monod, Francis Crick, Margaret Knight entre otros (4).

El *Manifiesto Humanista II* se publicó ante lo que se consideró una nueva revolución moral y defendía aspectos como el derecho al control de la natalidad, al aborto, al divorcio, a la libertad sexual entre adultos y a la eutanasia. Apareció por primera vez en *El Humanista* en septiembre / octubre de 1973, siendo Paul Kurtz y Edwin H. Wilson editor y redactor emérito, respectivamente (4).

## 2.3. Una *declaración humanista secular*

Fue publicada en 1980, solo 7 años después del *El Manifiesto Humanista II* ante los duros ataques que se habían lanzado sobre éste por parte de los fundamentalismos religiosos y de las fuerzas políticas conservadoras de Estados Unidos. Muchas de esas críticas sostenían que el humanismo era una religión y que en consecuencia, su enseñanza en las escuelas violaba el principio de separación entre Iglesia y Estado (Fig. 1).

La declaración defendía que el *humanismo secular* expresaba un conjunto de valores morales y un punto de vista filosófico y científico no teísta que no podían considerarse equivalente a una fe religiosa. De acuerdo con ello su enseñanza de modo alguno podía infringir el citado principio de separación, más bien lo contrario: apoyaba la idea democrática de que el estado secular debe

ser neutral, sin posicionarse ni en favor ni en contra de la religión. El término humanismo fue modificado por el de *humanismo secular*, que alude a un sistema ideológico que consta de una ética propia junto con la interpretación racional de los fenómenos naturales basados en los principios de la Ilustración. Afirma basarse en el método científico, la ética y el naturalismo filosófico, descarta el dogma religioso, el sobrenaturalismo, la pseudociencia y la superstición como las bases para la moralidad y la toma de decisiones.

Las marcas distintivas del *humanismo secular* son la preocupación por conjunto de la humanidad y su confianza en la ciencia y la tecnología para la mejora de la condición humana, idea precursora de lo que posteriormente podría conducir a la defensa del transhumanismo (5).

## 2.4. La *Declaración de Interdependencia*

En 1988, la Academia Internacional de Humanismo presentó un cuarto documento, una *Declaración de Interdependencia*, en el que se hacía un llamamiento a favor de una nueva ética global y de la construcción de una comunidad mundial que se estimaba cada vez más necesaria a la vista de las nuevas instituciones globales que se estaban desarrollando con rapidez.

## 2.5. El *Manifiesto humanista 2000*

Esa misma institución publicó algunos años después el *Manifiesto humanista 2000*, el más reciente y en el que se hace una llamada a renovar el pensamiento de la humanidad en aras a enfrentar los retos y problemas del nuevo siglo (Fig. 2). Se trata de un trabajo muy elaborado que se aprecia ya a partir de la propia sistematización de sus contenidos que reflejan los capítulos que lo integran: I. Preámbulo, II. Panoramas para futuro mejor, III. Naturalismo científico, IV. Los beneficios de la tecnología, V. Ética y Razón, VI. Un compromiso universal con la Humanidad en su conjunto, VII. Una Carta planetaria de derechos y responsabilidades, VIII. Una nueva agenda global, IX. La necesidad de nuevas instituciones planetarias y X. Optimismo en torno al panorama humano (6).

# Academia Internacional de Humanismo

## Manifiesto Humanista 2000

### Un llamamiento a favor de un nuevo humanismo planetario

Figura 2.



Dado el excelente, extraordinariamente prolijo y extenso trabajo que constituye el citado *Manifiesto* remito directamente a los lectores interesados al propio documento publicado. Pero sin perjuicio de ello, quisiera subrayar a continuación algunos puntos del *Manifiesto* que estimo particularmente relevantes. En concreto, la denuncia que realiza de los siguientes aspectos:

1. Existen sectores de la población mundial, en Asia, África, Centroamérica y Sudamérica que aún no disfrutan de prosperidad y que continúan en la pobreza, el hambre y la enfermedad.
2. Cada año desaparece casi un 2% de los bosques terrestres destacándose que este proceso continuará avanzando a menos que se adopten medidas preventivas.
3. El calentamiento global de la atmósfera probablemente está aumentando, en parte a causa de la deforestación producidas por las naciones ricas, que continúan devastando los recursos naturales.
4. Los gobiernos no han cumplido los compromisos asumidos: pocos de los países más ricos dan alguna prioridad a la ayuda a la mayoría de países pobres o incluso a los desahuciados y desposeídos de sus propias sociedades.
5. La suspensión del acuerdo sobre la igualdad de derechos para las mujeres está todavía extendida en la mayor parte de los países del mundo.
6. El principal mensaje del Humanismo en el contexto mundial actual es su compromiso con el naturalismo científico.
7. Existen graves peligros asociados al uso incontrolado de las tecnologías: las armas de destrucción masiva (nucleares, biológicas y químicas), las técnicas innovadoras en genéticas, biología e investigación médica (tales como la ingeniería biogenética, la clonación, el trasplante de órganos). Todo ello pese a que ofrecen inmensas posibilidades para la salud y el bienestar humanos a la vez entrañan importantes peligros.
8. La observación de los valores éticos más altos resulta esencial en la cosmovisión humanista.
9. El principio ético fundamental del *Humanismo Planetario* es la necesidad de respetar el valor y la dignidad de todas las personas de la comunidad mundial.
10. Los descubrimientos del ADN y la biología molecular han continuado revelándonos los mecanismos de la evolución y del funcionamiento mismo de la vida.
11. El objetivo más urgente y fundamental sería acrecentar la efectividad de las Naciones Unidas, transformándola en una asamblea de estados soberanos y eliminando el veto de los miembros permanentes.
12. La solución de los problemas de la Humanidad pasa necesariamente por el recurso a la razón, a la ciencia y al esfuerzo humano.

Este documento fue firmado por más de 120 intelectuales (filósofos, pensadores, científicos, literatos, etc.) y entre los cuales figura solo a un español Alberto Hidalgo Tuñón (Profesor de Sociología del Conocimiento de la Universidad de Oviedo, SAF, presidente del MPDLA) y un portugués el Premio Nobel, José Saramago (6).

Dada la semejanza y proximidad, desde mi punto de vista, entre los objetivos de el *Manifiesto Humanista* 2000 y los de la Agenda 2030 para el "Desarrollo Sostenible" aprobada en septiembre de 2015 por las Naciones Unidas considero de interés incorporar este trabajo (ANEXO). En ambos programas "se exige acelerar las soluciones dirigidas a los principales desafíos del mundo; desde la pobreza y la igualdad de género, hasta el cambio climático, la desigualdad y el cierre de la brecha financiera".

### 3. ANEXO. "AGENDA 2030 DE LA ONU PARA EL "DESARROLLO SOSTENIBLE"

En la Cumbre de la ONU celebrada en septiembre de 2015, los Estados Miembros aprobaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible (ODS, Sustainable Development Goals), <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/>, que incluye 17 Objetivos:

- Objetivo 1: Poner fin a la POBREZA. Poner fin a la pobreza en todas sus formas en todo el mundo.
- Objetivo 2: HAMBRE cero. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible.
- Objetivo 3: Buena SALUD. Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.
- Objetivo 4: EDUCACIÓN de calidad. Garantizar una educación inclusiva, equitativa y de calidad y promover oportunidades de aprendizaje durante toda la vida para todos.
- Objetivo 5: IGUALDAD de género. Lograr la igualdad entre los géneros y empoderar a todas las mujeres y niñas.
- Objetivo 6: AGUA limpia y saneamiento. Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos.
- Objetivo 7: ENERGÍA asequible y sostenible. Garantizar el acceso a una energía asequible, segura, sostenible y moderna para todos.
- Objetivo 8: TRABAJO decente y crecimiento económico. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.
- Objetivo 9: INDUSTRIA, innovación, infraestructura. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.



- **Objetivo 10: Reducir INEQUIDADES.** Reducir la desigualdad en y entre los países.
- **Objetivo 11: Lograr que las CIUDADES sean más inclusivas seguras, resilientes y sostenibles.**
- **Objetivo 12: CONSUMO responsable y producción.** Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles.
- **Objetivo 13: Acción CLIMÁTICA.** Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.
- **Objetivo 14: Vida MARINA.** Conservar y utilizar en forma sostenible los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.
- **Objetivo 15: Vida en la TIERRA.** Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, efectuar una ordenación sostenible de los bosques, luchar contra la desertificación, detener y revertir la degradación de las tierras y poner freno a la pérdida de diversidad biológica.
- **Objetivo 16: Paz, JUSTICIA e instituciones fuertes.** Promover sociedades pacíficas e inclusivas para el desarrollo sostenible, facilitar el acceso a la justicia para todos y crear instituciones eficaces, responsables e inclusivas a todos los niveles.
- **Objetivo 17: ALIANZAS para los objetivos.** Fortalecer los medios de ejecución y revitalizar la alianza mundial para el desarrollo sostenible.

En relación con los objetivos de la ONU para el 2030, y por extensión con los del *El Manifiesto Humanista 2000*, cabe comentar que el 13 de septiembre de este año la Fundación Bill y Melinda Gates publicó su sexto informe *Goalkeepers anual* sobre la viabilidad (<https://www.gatesfoundation.org/goalkeepers/report/2022-report/#Intro>). El Informe es desalentador ya que revela que hoy por hoy casi todos los indicadores apuntan que tales objetivos para el 2030 se encuentran muy lejos de alcanzarse.

Según sus proyecciones, en el mejor de los escenarios posibles, la humanidad no erradicará la desnutrición crónica, ni reducirá la mortalidad materna lo suficiente, ni ninguno del resto de los

objetivos propuestos. La pandemia, las guerras en Ucrania y Yemen, y el retroceso de los derechos de las mujeres “desde Afganistán hasta los Estados Unidos” han lastrado las aspiraciones de la comunidad internacional para un mundo más justo, pacífico y un planeta todavía habitable en 2030. A pesar de los importantes retrocesos causados por las crisis mundiales superpuestas, el informe es finalmente optimista y subraya las oportunidades para acelerar el progreso hacia el fin de la pobreza, la lucha contra la desigualdad y la reducción de los impactos de cambio climático. Enfatiza que “el fracaso no es inevitable”, y deja así abierta una rendija a la esperanza mediante la innovación (Alejandra Agudo, *El País*, 16 sept 2022)

#### 4. TRANSHUMANISMO

El transhumanismo encarna una filosofía que enmarca cambios muy significativos sobre el futuro del *Homo sapiens*. Propone utilizar las tecnologías desarrolladas durante las últimas décadas no solo para conocer las características del *Homo sapiens* como especie sino también para transformarlo de una manera profunda conduciendo al “desarrollo de una nueva especie biológica” (Fig.3). La convergencia entre la inteligencia artificial, la biotecnología y nanotecnología (desarrollo de ciborgs y cambios genéticos) pueden convertir al *Homo sapiens* en un proyecto de diseño, en una nueva especie (*¿Robot sapiens?*). Las nuevas tecnologías posibilitan la mejora de las capacidades físicas y mentales, el control del deseo, combatir las enfermedades y ralentizar los procesos de envejecimiento, ... mediante la modificación de la estructura genética de ser humano. La tecnología permite no solo conocernos sino asimismo modelarnos salvando las limitaciones y planificando las nuevas generaciones de modo que interfiere en el proceso evolutivo natural.

En consecuencia, si así se desarrolla el futuro, aparecerá una especie que vivirá muchos más años, con capacidades físicas y cognitivas mejoradas y se evitara en buena medida, las molestias y el dolor causado por las enfermedades y el envejecimiento. Ante



Figura 3. El símbolo H+ del transhumanismo

esta situación, la nueva especie no dependerá de la evolución natural, no dependerá de la naturaleza, sino de ella misma, siendo su propia supervisora.

Desde el punto de vista histórico sabemos que las primeras manifestaciones del interés por cambiar al hombre remiten a los exploradores que buscaron la fuente de la eterna juventud, alquimistas que trabajaron para elaborar el elixir de la vida y diversas escuelas esotéricas.

Fue a partir de la publicación de "El origen de las especies", por Darwin, en 1859, cuando diversos autores comenzaron a especular sobre si las características del hombre no serían definitivas, sino una fase más de su evolución natural (7). Posteriormente, en 1924, el bioquímico británico J. B. S. Haldane sugirió en su ensayo *Dédalo e Ícaro: La ciencia y el futuro*, que en la genética se encontraban las bases que determinan las características del hombre y que, mediante ella, la eugenesia, constituiría una pieza fundamental en el desarrollo de una sociedad futura ideal (8).

El impacto social de la obra de Haldane fue cardinal y tanto científicos como no científicos mostraron su preocupación por que con el progreso de la medicina y de las ayudas sociales posibilitara la sobrevivencia de individuos que, en épocas anteriores, habrían muerto de forma que dicha supervivencia pudiera conducir a la pérdida de la calidad genética del *Homo sapiens*. Ante esta situación gobiernos como los de Estados Unidos, Canadá, Australia, Suecia, Dinamarca, Finlandia y Suiza diseñaron o promovieron programas eugenésicos basados en la esterilización de individuos, programas que vulneraban derechos civiles. Estos programas fueron puestos en marcha por los nazis del gobierno nacionalsocialista alemán al llevar a cabo la matanza de millones de personas considerados por ellos "inferiores".

Lo verdaderamente significativo de estos programas es que siguieron activos muchos años después de finalizar la 2ª guerra mundial en 1945. En los EEUU, entre 1907 y 1963 unos 64.000 individuos fueron esterilizados a la fuerza bajo las leyes de eugenesia, hasta que en el último de los años citados fueron definitivamente eliminados (9).

A partir de 1945 la ciencia empieza a alcanzar a la especulación y ante esta perspectiva diversos pensadores se inquietan al imaginar que el desarrollo científico-tecnológico pueda utilizarse para alterar la condición humana. Así, la medicina alcanza un hito con el descubrimiento de la estructura molecular del ADN en 1953 y la sustitución de las tecnologías analógicas, mecánicas y electrónicas por la digital configuran una amplia avenida hacia un mundo más desarrollado.

El término trashumanismo fue introducido por Julián Huxley, hermano de Aldous Huxley y autor de "Un mundo Feliz", en su obra "New Bottles for New Wine" publicada en 1957. En ella, J. Huxley afirma que el hombre debe "transcenderse así mismo" y consideraba el transhumanismo como "una nueva ideología" apropiada para la nueva situación del hombre" (10).

Al final de la Segunda Guerra Mundial, los países participantes se quedaron en gran parte devastados en contraste con la prosperidad de EEUU y con el desarrollo de sus universidades y centros de investigación. Éstos actuaron atrayendo a numerosos profesores e investigadores europeos a la vez que las nuevas ideas sobre el transhumanismo se desarrollaban en dicho país.

En esos años la biotecnología se desenvuelve significativamente, desarrollando técnicas capaces de provocar la mejora directa del ser humano, entre las que se cuentan la prolongación de la vida, la críonica o la colonización del espacio motivando la aparición de grupos transhumanistas especializados (11).



Figura 4. Evolución según el transhumanismo

El filósofo estadounidense Max More articuló en 1990 los principios del transhumanismo como una filosofía futurista, y lideró en California un grupo de intelectuales que fundó el Extropy Institute (12).

La primera declaración transhumanista fue formulada por Fereidoun M. Esfandiary (FM-2030) en su Upwingers Manifesto en 1978, ofreciendo una visión optimista del futuro e integrando una referencia a la idea política de que ni la izquierda ni la derecha realizarían los cambios necesarios para la consecución de un futuro más prometedor (Fig. 4).

En 1990, un código más formal y concreto para los transhumanistas libertarios tomó la forma de los Principios Transhumanistas de Extropía, constituyendo el extropismo una síntesis del transhumanismo y el neoliberalismo. Y finalmente, en 1999, la Asociación Mundial Transhumanista y sus miembros escriben y adoptan la Declaración Transhumanista:

#### 4.1. Declaración Transhumanista

##### *Asociación Transhumanista Mundial*

- 1.- En el futuro, la humanidad cambiará de forma radical por causa de la tecnología. Prevemos la viabilidad de rediseñar la condición humana, incluyendo parámetros tales como lo inevitable del envejecimiento, las limitaciones de los intelectos humanos y artificiales, la psicología indeseable, el sufrimiento, y nuestro confinamiento al planeta Tierra (Fig. 5).
- 2.- La investigación sistemática debe enfocarse en entender esos desarrollos venideros y sus consecuencias a largo plazo.
- 3.- Los transhumanistas creemos que siendo generalmente receptivos y aceptando las nuevas tecnologías, tendremos una mayor probabilidad de utilizarlas para nuestro provecho que si intentamos condenarlas o prohibirlas.

4.- Los transhumanistas defienden el derecho moral de aquellos que deseen utilizar la tecnología para ampliar sus capacidades mentales y físicas y para mejorar su control sobre sus propias vidas. Buscamos crecimiento personal más allá de nuestras actuales limitaciones biológicas.

5.- De cara al futuro, es obligatorio tener en cuenta la posibilidad de un progreso tecnológico dramático. Sería trágico si no se materializaran los potenciales beneficios a causa de una tecnofobia injustificada y prohibiciones innecesarias. Por otra parte, también sería trágico que se extinguiera la vida inteligente a causa de algún desastre o guerra ocasionados por las tecnologías avanzadas.

6.- Necesitamos crear foros donde la gente pueda debatir racionalmente qué debe hacerse, y un orden social en el que las decisiones serias puedan llevarse a cabo.

7.- El transhumanismo defiende el bienestar de toda conciencia (sea en intelectos artificiales, humanos, animales no humanos, o posibles especies extraterrestres) y abarca muchos principios del humanismo laico moderno. El transhumanismo no apoya a ningún grupo o plataforma política determinada.

La Declaración Transhumanista está disponible en el sitio web de la Transhumanist World Association (WTA) <http://www.transhumanism.org> y el sitio web de Nick Bostrom. Para obtener más información acerca de la Organización Mundial Transhumanista (que ha cambiado su nombre a Humanidad +) consulte los sitios web: <http://www.transhumanism.org> y <http://humanityplus.org>. En general, la WTA apoya una agenda democrática más liberal que otros grupos transhumanistas. Sobre la política del movimiento, véase James J. Hughes, "La política del transhumanismo", <http://www.changesurfer.com/Acad/TranshumPolitics.htm>.

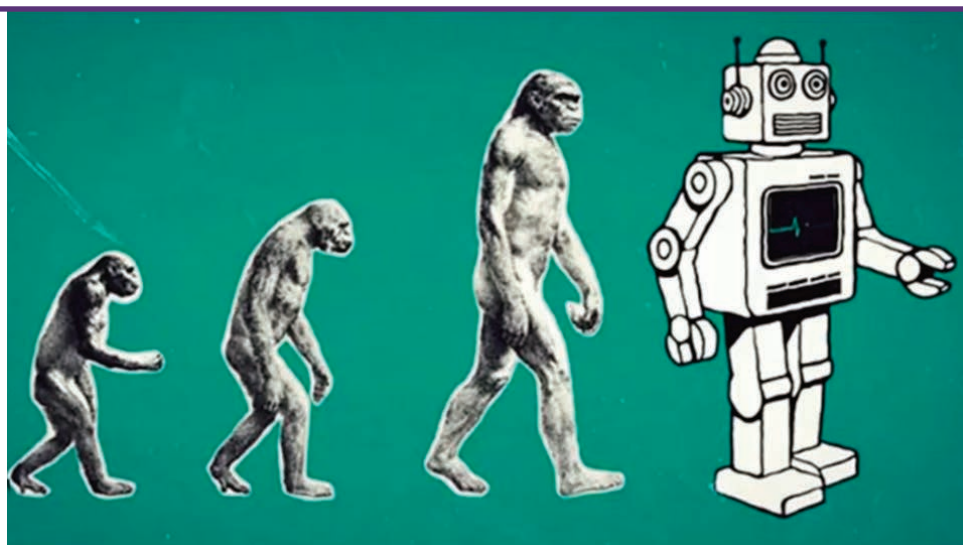


Figura 5. Un futuro aparentemente inevitable (<https://www.bbc.com/mundo/noticias-42751366>)



La idea de modificación del hombre a través de las nuevas tecnologías ha atraído a muchos partidarios. Entre ellos citaré a Ronald Bailey que considera que el transhumanismo es un «movimiento que personifica las más audaces, valientes, imaginativas e idealistas aspiraciones de la humanidad» (14). Pero esta doctrina y también ha concitado duras críticas habiendo sido descrito por Francis Fukuyama como “la idea más peligrosa del mundo” (15). Para finalizar, quisiera destacar que los transhumanistas aceptan que existan personas que prefieran continuar siendo “humanos” y que su decisión deba ser respetada.

## 5. CONCLUSIONES

De lo que hasta aquí he expuesto cabe concluir que el Humanismo valora al ser humano en su sentido más amplio al reconocerle capacidades intelectuales potencialmente mejorables (educación física, cultura, ...) pero siempre hasta hoy manteniendo inviolables sus características genéticas. Según los humanistas la búsqueda del saber y el dominio de diversas disciplinas es condición necesaria para el desarrollo y buen uso de estas facultades que nos debe conducir a desarrollar una sociedad mejor.

Por otro lado, los transhumanistas proponen que el hombre pueda corregir errores humanos incluyendo los genéticos (hemofilia, daltonismo, ...) y se habla en ese sentido del “hombre reparado” y que además pueda adquirir capacidades adicionales (mayor memoria, mayor potencia física, ... que no posee mediante las nuevas tecnologías “el hombre aumentado” lo que incluye el desarrollo de cibernéticos y de los cambios genéticos adecuados. Ello puede conducir al desarrollo de una nueva especie del género *Homo* más inteligente, más longeva y con mayor potencial psicológico, pero también plantea problemas éticos que no tienen cabida en la realidad social de nuestra civilización actual.

Mientras que las propuestas del Humanismo y las del “hombre reparado” no entrañan conflictos éticos relevantes, no sucede lo mismo con las que tienen ver con el “hombre aumentado”. En lo que respecta a estas últimas sugiero, como medida previa a su consideración, recurrir a la razón, a la ciencia y a la responsabilidad componentes esenciales de una ética que nos va a permitir resolver los grandes desafíos que implica la posibilidad de desarrollar más de una especie del género *Homo*.

## Notas finales:

El original de este trabajo ha sido completado en parte con retazos encontrados en la bibliografía citada y en la red. Una exposición más extensa sobre el transhumanismo y los bioconservadores, acompañada de una reflexión final propia del autor se pre-

sentó en: “La revolución científico-tecnológica. ¿Puede el *homo sapiens* ser programado?” Discurso leído por el autor en la lección inaugural del curso académico de la Real Academia Nacional de Farmacia celebrada el 14 de enero de 2021.

Un excelente estudio sobre el transhumanismo incluyendo antecedentes históricos se encuentra en Bostrom, N. 2011. Una historia del pensamiento transhumanista. Argumentos de Razón Técnica, nº 14, 2011, pp. 157-191. Para más información, véase también y la Declaración de la Asociación Transhumanista Mundial (<http://www.changesurfer.com/Acad/TranshumPolitics.htm>).

## 6. REFERENCIAS

1. <https://es.wikipedia.org/wiki/Humanismo>.
2. <https://es.wikipedia.org/wiki/Transhumanismo>
3. [https://es.wikipedia.org/wiki/Manifiesto\\_Humanista\\_I](https://es.wikipedia.org/wiki/Manifiesto_Humanista_I)
4. [https://es.wikipedia.org/wiki/Manifiesto\\_Humanista\\_II](https://es.wikipedia.org/wiki/Manifiesto_Humanista_II)
5. [https://es.wikipedia.org/wiki/Humanismo\\_secular](https://es.wikipedia.org/wiki/Humanismo_secular)
6. <https://www.filosofia.org/cod/c1999hum.htm>
7. Darwin, C. 2003, The origin of the species, Barnes & noble classics. New York, NY: Fine Creative Media.
8. Haldane J. B. S. 1924, Dédalo; o, ciencia y el futuro. Nueva York: E. P. Dutton & Co, 1924), 80.
9. [https://es.wikipedia.org/wiki/Esterilizaci%C3%B3n\\_forzada\\_en\\_los\\_Estados\\_Unidos](https://es.wikipedia.org/wiki/Esterilizaci%C3%B3n_forzada_en_los_Estados_Unidos)
10. Julian Huxley, 1957, New Bottles for New Wine. Londres: Chatto & Windus, 1957), 17. 3 Ibid. 4 Ibid., 255.
11. Tirosh-Samuelson H. 2017, Cautivados por el transhumanismo, Perifèria. Cristianisme, Postmodernitat, Globalització.
12. [https://es.wikipedia.org/wiki/Max\\_More](https://es.wikipedia.org/wiki/Max_More)
13. <http://www.transhumanism.org>.
14. Bailey, R. 2004. Transhumanism: the most dangerous idea? Archivado desde el original el 12 de octubre de 2008. URL accedida el 20 de febrero de 2006.
15. Fukuyama, F. 2004. “Transhumanism”. Foreign Affairs September/October.
16. <https://afcv.es/public/Attachment/2021/4/DISCURSOINAUGURAL-RafaelSentandreu3.pdf>.

Si desea citar nuestro artículo:

### Introducción al humanismo y al transhumanismo

Rafael Sentandreu Ramón

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022). · pp. 437-444

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.11>

# ALTERNATIVAS SOSTENIBLES EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS. APLICACIONES EN LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS

## SUSTAINABLE ALTERNATIVES IN LIQUID CHROMATOGRAPHY. APPLICATIONS IN DRUG ANALYSIS

**María Antonia Martín<sup>1,2</sup>, Felipe Andrés Bravo-Lambie<sup>1,‡</sup>, Fresia Melina Silva-Sofrás<sup>1,‡</sup>, María del Mar Caja<sup>1</sup>, Ana Isabel Olives<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Química Analítica, Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid (España).

<sup>2</sup>Académica correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>#</sup>Laboratorio Toxicológico, Servicio de Medicina Legal, Bernardo O'Higgins 2210, Iquique, Chile.

<sup>‡</sup>Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, UBA-CONICET.

**corresponding author:** mantonia@farm.ucm.es

### ARTÍCULO

#### RESUMEN

El desarrollo de metodologías analíticas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente implica entre otros objetivos el consumo reducido de reactivos y disolventes, así como la disminución de los residuos generados o la reutilización de los mismos en un proceso circular. Si hay una técnica analítica con más amplia utilización tanto en los laboratorios de la industria farmacéutica como en los laboratorios de control, esta es la cromatografía de líquidos. En este trabajo se realiza una breve revisión de las estrategias a seguir para lograr unas metodologías de separación sostenibles sin renunciar a las características de sensibilidad, selectividad, eficacia, precisión y exactitud que acompañan a una técnica sólida y establecida como es la HPLC. Además, se demuestra la utilización de fases estacionarias de sílice superficialmente porosa tipo "core-shell", que, por sus características de tamaño y porosidad, puede suponer un ahorro de un 50% en el volumen de los residuos generados, o el empleo de fases móviles modificadas con líquidos iónicos que permite la reducción de los tiempos de análisis con el objetivo de lograr una cromatografía respetuosa con el medio ambiente. Se discuten estas alternativas en el contexto del análisis de fármacos

#### ABSTRACT

*The development of sustainable and environmentally friendly analytical methodologies involves, among other objectives, the reduced consumption of reagents and solvents, as well as the reduction of the waste generated or the reuse of the same in a circular process. If there is one analytical technique that is more widely used in both pharmaceutical industry laboratories and control laboratories, it is liquid chromatography. In this work, a brief review is made about the strategies to be followed to achieve sustainable separation methodologies without renouncing the characteristics of sensitivity, selectivity, efficiency, precision and accuracy that accompany a solid and established technique such as HPLC. In addition, the use of stationary phases with superficially porous silica particles, "core-shell" type, which, due to their size and porosity characteristics, can lead to a saving of 50% in the volume of waste generated. Furthermore, the use of modified mobile phases with ionic liquids allows the reduction of analysis times with the aim of achieving an environmentally friendly chromatography. These alternatives are discussed in the context of drug analysis*

#### Palabras Clave:

modificadores de fases móviles  
líquidos iónicos  
partículas superficialmente porosas  
fármacos antitumorales

#### Keywords:

mobile phase additives  
ionic liquids  
superficially porous silica particles  
anti-cancer drugs



## 1. INTRODUCCIÓN

Los últimos treinta años se han caracterizado por una mejora de los estándares de calidad de vida en los países industrializados. En determinados aspectos, ello tiene consecuencias negativas en el medio ambiente. De ello surge la motivación y la búsqueda de metodologías respetuosas con el medioambiente ("environmentally-friendly") (1,2). En el campo de la química analítica, se han ido introduciendo metodologías, procedimientos y técnicas cuya finalidad es reducir el impacto medioambiental que de los distintos métodos analíticos se derivan (3). Desde el control de calidad de materias primas y productos terminados en la industria farmacéutica, las determinaciones analíticas en laboratorios de control oficiales (Agencias Estatales y Europeas, de control de medicamentos, alimentos, contaminantes ambientales...) hasta en la rutina de los laboratorios de análisis clínicos, se ha intentado buscar métodos calificados como "verdes" o "sostenibles", que tiendan a disminuir los residuos generados en el proceso analítico. En los últimos años distintas publicaciones científicas de revisión en el campo de la química analítica sostenible (4,5,6) analizan cómo las metodologías que, desarrolladas para un formato que podríamos denominar convencional, se han transformado en metodologías sostenibles. Así, una gran parte de los procedimientos de pre-tratamiento analítico se ha transformado en sus equivalentes "micro" o miniaturizados (7,8).

En los últimos años se han ido introduciendo diferentes formas de evaluar la sostenibilidad de los métodos analíticos (9) como: NEMI (National Environmental Method Index), GAPI (Green Analytical Procedure Index), AMGS (Analytical Method Greenness Score), y AGREE (Analytical greenness), entre otros. La reducción del número y del tamaño de la muestra, la elección de las técnicas de muestreo directo tratando de evitar aquellas que impliquen un pre-tratamiento, la miniaturización en las medidas, las determinaciones analíticas "in situ", así como la utilización de disolventes y reactivos "renovables" y "reutilizables", la disminución de residuos generados, o bien, el descenso del consumo de energía, son algunas

de las variables a considerar para que una técnica analítica pueda ser calificada como sostenible.

Pocas técnicas instrumentales han alcanzado tanto grado de madurez y aplicación para los análisis de rutina como la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Ello se debe en parte a la gran diversidad de las aplicaciones de esta técnica en aspectos tan significativos como el análisis y purificación de fármacos, la determinación de parámetros de interés en clínica y toxicología o el análisis y la cuantificación de numerosos compuestos de interés biológico, nutricional y medioambiental. Hoy en día, la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica más empleada rutinariamente en la industria farmacéutica. Aunque la cantidad de residuos de disolventes orgánicos generada por un equipo de HPLC utilizado a pleno rendimiento no es demasiado grande (aprox. 0,5-1 L/día), el efecto acumulativo de cientos de miles de equipos de HPLC de todo el mundo hace que el volumen de residuos generados a nivel global sea preocupante (10). Por ello, cada vez son mayores los esfuerzos por hacer de la cromatografía de líquidos una técnica analítica "verde" (11) dentro de lo que se denomina *química sostenible*. En el caso de la cromatografía, estos esfuerzos se basan en reducir el volumen de los disolventes de desecho, reemplazar los disolventes no respetuosos con el medio ambiente por otros que sí lo son (agua y alcoholes (12)), y reciclar (13) los disolventes a través de procesos respetuosos con el medio ambiente. Por todo ello, los profesionales que trabajamos en cromatografía y sabemos de su gran eficacia y versatilidad como técnica analítica debemos preguntarnos: *¿Cómo podemos convertir la cromatografía de líquidos en una metodología más respetuosa con el medio ambiente?* La respuesta más sencilla a esta pregunta se basa en el diseño y desarrollo de metodologías en las que el volumen de los residuos generados sea mínimo y, además, éstos sean respetuosos con el entorno. Si nuestra muestra a analizar contiene compuestos contaminantes, se tratará de tomar medidas para evitar que contamine en gran escala a los residuos generados en el análisis. Esta idea se esquematiza en la Figura 1.

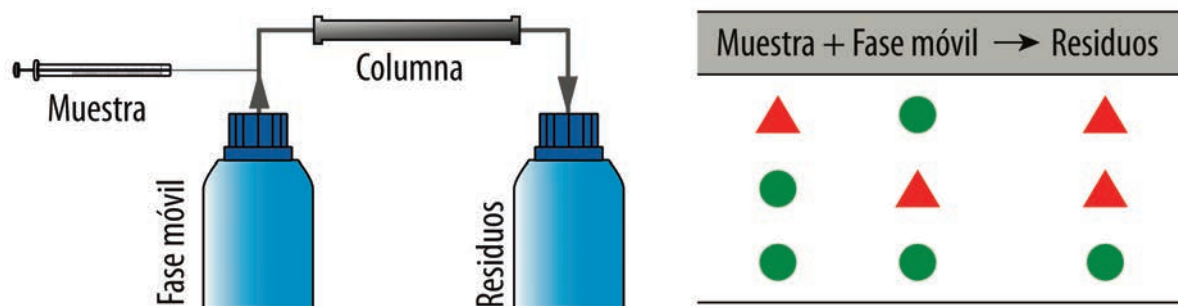


Figura 1. Tipos de residuos generados en cromatografía en función de la naturaleza de la muestra y de los disolventes empleados en la fase móvil. El color rojo simboliza la situación desfavorable, y el color verde indica un resultado favorable desde el punto de vista medioambiental.



"A priori", en cromatografía de líquidos, la forma más sencilla de reducir el consumo de disolventes y residuos, es reducir el tiempo de análisis, lo que a su vez conlleva un importante ahorro energético. En equipos convencionales de HPLC se puede lograr reducir el tiempo de análisis y por tanto el consumo energético:

- Reduciendo la longitud de la columna (por ejemplo 50 mm frente a 150 mm convencionales)
- Reduciendo el diámetro interno de la columna (por ejemplo 2,1 mm frente a 4,6 mm convencionales)(10, 14).
- Reduciendo el tamaño de las partículas que forman la fase estacionaria (por ejemplo 3  $\mu\text{m}$  frente a 5  $\mu\text{m}$ )

La modalidad denominada UHPLC ("Ultra-High Pressure Liquid Chromatography"), proporciona separaciones rápidas y eficaces con un ahorro de hasta un 80% en el consumo de disolventes, dado que el tiempo de análisis puede reducirse a la décima parte en comparación con los sistemas convencionales de HPLC. De esta manera son posibles separaciones rápidas sin sacrificar la resolución, gracias a la utilización de columnas empaquetadas con partículas de diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, la reducción del tamaño de partícula conlleva el aumento en la presión en la columna así como el calentamiento por fricción debido a las presiones elevadas. Además, se hace necesario el empleo de bombas capaces de trabajar a presiones más elevadas (max. 1300-1500 bares, UHPLC) que las utilizadas en separaciones convencionales (máx. 400-600 bares, HPLC). Así, mientras que columnas empaquetadas con partículas totalmente porosas con tamaños de partícula de 3-5  $\mu\text{m}$  dan separaciones robustas independientemente del equipo instrumental de HPLC empleado, sin embargo, la elección del equipo instrumental para UHPLC trabajando con partículas totalmente porosas con diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$  resulta determinante (15). Por todo ello hay que considerar: a) los volúmenes extra columna, e intentar redu-

cirlos o minimizarlos, b) las características técnicas de las bombas y los inyectores, y c) la importancia de los hornos para columnas en la eficacia y selectividad de las separaciones. La Figura 2 muestra una comparación de las características de las columnas rellenas con partículas superficialmente porosas.

Una alternativa respetuosa con el medio ambiente y cuyas condiciones de trabajo no implican presiones tan elevadas como el UHPLC, es la utilización de columnas empaquetadas con partículas de sílice superficialmente porosa, tipo "core-shell". Estas partículas están constituidas por un núcleo duro de sílice fundida rodeado de una serie de capas de sílice porosa que les confieren características idóneas desde el punto de vista cromatográfico.

Las fases estacionarias de núcleo de sílice fundido (16,17, 18) se conocían desde mediados de los años 90 del siglo pasado, pero se empezaron a comercializar en 2006. Están disponibles en una variedad química considerable de rellenos con un gran potencial en la resolución de problemas analíticos (19), y, además, presentan significativas ventajas con respecto a las partículas totalmente porosas; así, partículas superficialmente porosas de 5  $\mu\text{m}$  poseen la eficacia de las separaciones comparable a la de partículas totalmente porosas de 2  $\mu\text{m}$  permitiendo trabajar a presiones bajas similares a las presiones de trabajo en HPLC pero con eficacias semejantes a las de UHPLC, lo que conlleva una disminución en el tiempo de análisis de 3-10 veces y un ahorro en el consumo de energía y disolventes que varía entre el 50-80 % según las condiciones de separación. Además, a diferencia de las fases estacionarias de partículas sub-2  $\mu\text{m}$  totalmente porosas utilizadas en UHPLC, las fases estacionarias de partículas superficialmente porosas pueden utilizarse en equipos de HPLC convencionales y sólo requieren adaptaciones sencillas como la reducción en el diámetro interno de las conexiones para reducir el volumen muerto, ya que volúmenes

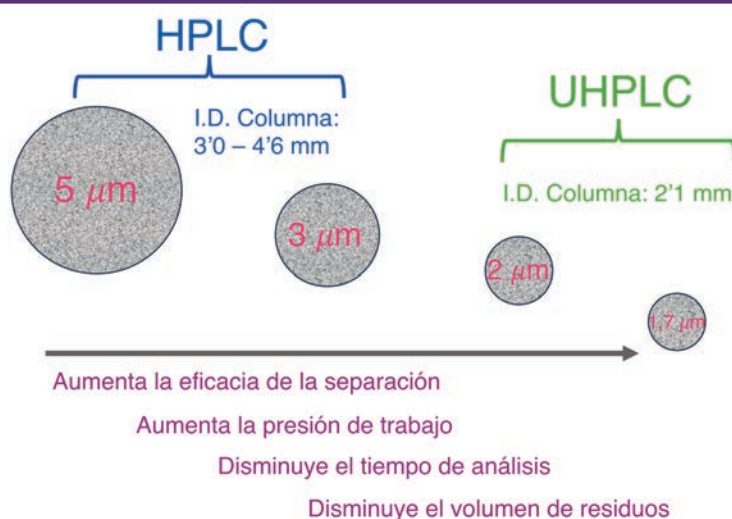


Figura 2. Comparación de las características de las separaciones en cromatografía de líquidos (HPLC y UHPLC) según el tamaño de las partículas de sílice totalmente porosa empleado en las columnas analíticas.

mueritos significativos contribuyen a la disminución de la eficacia. Presentan la desventaja de que su capacidad de carga es sensiblemente menor por lo que hay que inyectar disoluciones suficientemente diluidas. En la Figura 3 se muestran dos cromatogramas correspondientes a la separación de los dos mismos compuestos en una fase superficialmente porosa y totalmente porosa. Se puede apreciar que la retención de los analitos en las fases "core-shell" es significativamente menor como se ilustra con las flechas, y ello se traduce en menores tiempos de retención con eficacias mayores.

Asimismo, se pueden lograr separaciones sostenibles utilizando fases estacionarias convencionales y modificando las fases móviles mediante la utilización de disolventes respetuosos con el medio ambiente, así como el empleo de agua a temperaturas elevadas y en condiciones de temperatura sub-crítica (20). Estas alternativas han sido revisadas detalladamente (4). La sustitución de acetonitrilo por etanol y otros disolventes eco-compatibles ha sido exhaustivamente revisada y aplicada al análisis de fármacos (21). Por ejemplo, la separación isocrática de rosuvastatina utilizando fases estacionarias de octilsilano y como fase móvil etanol:metanol:acetato de etilo (6:3:1) altamente eco-compatible proporciona una buena sensibilidad y exactitud para la determinación de este principio activo en formas farmacéuticas (22).

El empleo de aditivos en las fases móviles fundamentalmente tensioactivos (23, 24), ciclodextrinas (25, 26) o líquidos iónicos (27, 28) permite la utilización de fases móviles mayoritariamente acuosas con columnas y equipos de HPLC convencionales, lo que convierte las separaciones en metodologías sostenibles.

Los líquidos iónicos (ILs) lo constituyen un amplio y complejo grupo de compuestos, sales líquidas a temperatura inferior a 100°C. Las singulares propiedades que poseen se deben a que son compuestos completamente iónicos semejantes a las sales clásicas como el NaCl, por ello difieren significativamente de los líquidos moleculares (disolventes en general). Tienen muy baja volatilidad, buena estabilidad térmica, buena conductividad electrolítica, amplio intervalo de viscosidades, buena miscibilidad y además no son inflamables (29). Están constituidos por un catión orgánico (alquilpi-

ridinio, alquilpirrolidino, alquilimidazolinio, alquilfosfonio, alquilamonio) y un contraión que suele ser inorgánico, desde cloruro a tetrafluoroborato. Los ILs poseen un gran potencial de aplicación en las distintas técnicas analíticas; en cromatografía de líquidos, puesto que son miscibles con una gran variedad de disolventes utilizados en HPLC, tanto agua como disolventes orgánicos. Así se ha descrito la significación de la adsorción de estos líquidos iónicos sobre los grupos silanol (30) de las fases estacionarias que no ha sido recubiertos de forma efectiva en el proceso de "end-capping" lo que conlleva a un significativo incremento de la eficacia de la separación. Incrementan la selectividad de las separaciones debido a la interacción con los analitos y generan separaciones más eficaces debido a su adsorción sobre las fases estacionarias. Reducen la retención de los analitos básicos sobre las fases estacionarias al mismo tiempo que favorecen la simetría de los picos e incrementan la resolución de numerosos compuestos (31, 32).

En el presente artículo se describe la separación de antitumorales inhibidores de topoisomerasas utilizando fases estacionarias superficialmente porosas y se compara con la separación en fases estacionarias convencionales utilizando líquidos iónicos como aditivos en las fases móviles y se valoran las ventajas y limitaciones no solamente desde las condiciones analíticas de la separación sino también desde el punto de vista de la sostenibilidad.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Instrumentación y reactivos

Para la verificación de la concentración de las disoluciones patrón de los antitumorales a separar se ha empleado un espectrofotómetro de absorción UV-Vis de doble haz Kontron Uvikon 810P y un espectrofotómetro de absorción UV-VIS Cary 60 de Agilent controlado mediante el software Cary WinUV8, siempre se han utilizado cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se utilizó un pH-metro Crison Micro-pH 2001 calibrado diariamente con disoluciones reguladoras de pH 4,00 y 7,00, para la preparación de las disoluciones tampón empleadas en las separaciones.

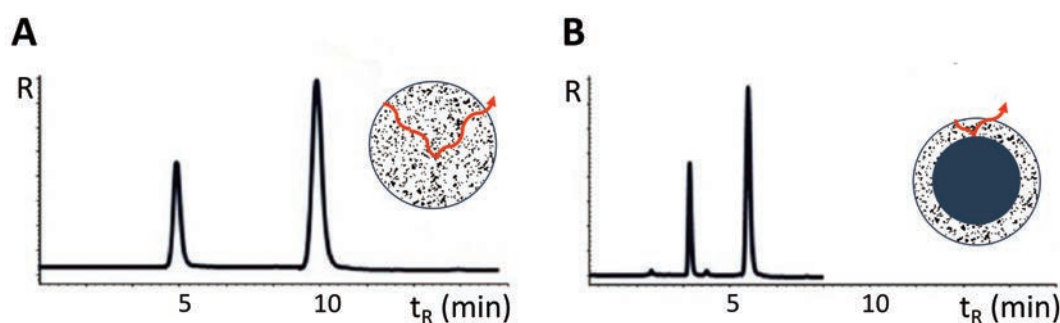


Figura 3. Cromatogramas obtenidos en las separaciones de dos analitos en fases estacionarias de partículas de sílice totalmente porosa (A) y partículas de sílice superficialmente porosa, "core-shell" (B). R: respuesta del detector,  $t_R$ : tiempo de retención

En las separaciones cromatográficas se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos HPLC de la firma Merck-Hitachi provisto de una bomba de gradiente cuaternario (L-7100), un sistema de termostatación por efecto Peltier para columnas (Horno L-2300), el cual se programó para mantener la temperatura a 25 °C para todas las separaciones. El equipo posee un detector de fluorescencia (L-7485). Como condiciones de detección se utilizó  $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$  ya que a estas longitudes de onda tanto la camptotecina como la luotonina A se excitan y emiten. El control del sistema cromatográfico fue realizado por ordenador a través del software HPLC System Manager, versión 4.1. En los experimentos con columnas de sílice totalmente porosa se emplearon capilares de acero inoxidable de  $1000 \times 0,2 \text{ mm}$  (longitud  $\times$  diámetro interno) del inyector a la columna y de PTFE de  $450 \times 0,2 \text{ mm}$  (longitud  $\times$  diámetro interno) de la columna al detector. En estas condiciones experimentales, se empleó un inyector Rheodyne 7725i con bucle de  $20 \mu\text{L}$ . En el caso de las columnas de sílice superficialmente porosa se utilizaron capilares Viper (Dionex) de  $750 \times 0,13 \text{ mm}$  (longitud  $\times$  diámetro interno) y de  $350 \times 0,13 \text{ mm}$  (longitud  $\times$  diámetro interno) como conexiones del inyector a la columna y de la columna al detector respectivamente, con el fin de reducir el volumen muerto y minimizar el ensanchamiento de los picos. En estas condiciones experimentales, se empleó un inyector Rheodyne 7725i con bucle de  $5 \mu\text{L}$  con la finalidad de adaptarlo a la capacidad de carga de las columnas de sílice superficialmente porosa. Las columnas empleadas fueron: a) columna analítica para elución en fase inversa Luna C18 (sílice totalmente porosa,  $5 \mu\text{m}$ ,  $150 \times 3 \text{ mm}$ ; tamaño de partícula, longitud  $\times$  diámetro interno) de Phenomenex; y b) columna analítica para elución en fase inversa Kinetex C18 (sílice superficialmente porosa,  $2,6 \mu\text{m}$ ,  $50 \times 3 \text{ mm}$ ; tamaño de partícula, longitud  $\times$  diámetro interno) de Phenomenex, equipada con una pre-columna de seguridad también C18 de Phenomenex.

Todos los disolventes utilizados fueron calidad espectroscopía o calidad cromatografía. El agua ultrapura se obtuvo gracias al equipo Milli-Q Direct 8 de Millipore. Los antitumorales camptotecina y luotonina A fueron suministrados por Sigma. Los líquidos iónicos cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolinio y cloruro de 1-butil-1-metil-pirrolidinio también se adquirieron en Sigma-Merck.

Las fases móviles se filtraron con ayuda de vacío, a través de filtros de membrana de poliamida de tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  y  $47 \text{ mm}$  de diámetro (GPH, Waters) en el caso de las columnas Luna C18, y filtros de membrana de nylon de tamaño de poro de  $0,22 \mu\text{m}$  y  $47 \text{ mm}$  de diámetro (Phenomenex) en el caso de las columnas Kinetex C18. En ambos casos seguidamente se aplicó sonicación durante 30 min para facilitar su desgasificación.

## 2.2 Preparación de patrones, líquidos iónicos y disoluciones tampón

Se prepararon disoluciones patrón de camptotecina y luotonina A, pesando una cantidad apropiada y disolviéndola en dimetilsulfóxido en concentración  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ . Se verificó el valor de la concentración de estas disoluciones mediante la determinación espectrofotométrica de disoluciones 100 veces diluidas en etanol o acetonitrilo. Se determinó exactamente el valor de la concentración a través de la absorbancia medida en los máximos de absorción y teniendo en cuenta los valores de las absorptividades molares, para la camptotecina ( $\lambda_{\text{max}} = 368 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 27530$ ) (33) y la luotonina A ( $\lambda_{\text{max}} = 342 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 16218$ ) (34). Estas disoluciones se alicuotaron y se mantuvieron a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las disoluciones de camptotecina y luotonina A se prepararon independientemente en concentración  $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$  en las fases móviles, según las condiciones experimentales a estudiar y seguidamente se filtraron a través de filtros de muestras de  $45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las disoluciones de camptotecina se mantuvieron en baño de hielo para reducir al mínimo la formación del carboxilato de la camptotecina.

Se prepararon disoluciones acuosas de 1-butil-3-metil-imidazolinio, y cloruro de 1-butil-1-metil-pirrolidinio en concentración  $0,5 \text{ M}$  ( $500 \text{ mM}$ ) y a partir de estas se ensayaron las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y  $50 \text{ mM}$  en tampón acético/acetato de amonio  $10 \text{ mM}$  ( $\text{pH} = 3,0$ ) como parte acuosa integrante de la fase móvil.

Las separaciones se realizaron en elución isocrática, acetonitrilo:agua; 40:60 y 35:65; v:v utilizando un caudal de  $0,5 \text{ mL/min}$  en el caso de las columnas de sílice totalmente porosa y con una fase móvil acetonitrilo:tampón acetato; 35:65; v:v utilizando un caudal de  $0,5 \text{ mL/min}$  en las columnas de sílice superficialmente porosa.

Para evaluar la eficacia de la separación se determinó el número de platos teóricos, siguiendo el criterio de la Farmacopea Europea.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados previos de nuestro grupo de investigación en las separaciones cromatográficas de antitumorales inhibidores de topoisomerasas permiten la separación de camptotecina y un grupo de análogos de luotonina A (14, 34). Además hemos podido demostrar la eficacia en la estabilización de la camptotecina mediante cromatografía de líquidos cuantificando las formas farmacológicamente activas de camptotecina (lactona) y la forma carente de actividad (carboxilato) gracias a la determinación de ambas por RP-HPLC y empleando la luotonina A como patrón interno. En este

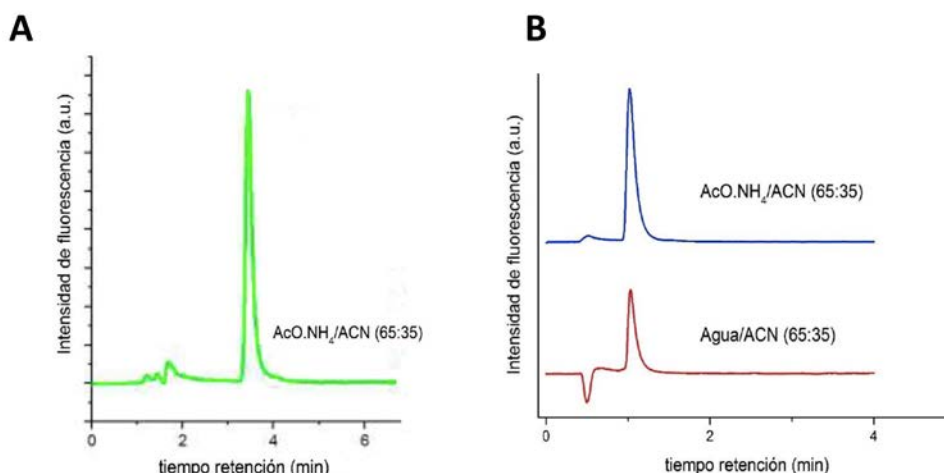


Figura 4. Cromatogramas obtenidos en las separaciones de camptotecina en fases estacionarias C18 de partículas de sílice totalmente porosa (A) y partículas de sílice superficialmente porosa, "core-shell" (B). Caudal 0,5 mL/min. Fase móvil agua o tampón acuoso de acetato amónico 0,15 M (pH 6,5) y acetonitrilo (ACN) en las proporciones indicadas.

trabajo hemos puesto de manifiesto el incremento de la actividad antitumoral de ambos productos naturales (camptotecina y luotonina A) mediante la vehiculización de los mismos en forma de complejos de inclusión con ciclodextrinas (35).

En el presente trabajo se describe la separación de camptotecina en columnas de sílice modificada y empaquetadas con partículas de núcleo de sílice superficialmente porosas y se compara su comportamiento cromatográfico con las columnas convencionales de sílice totalmente porosa. Para ello se ha empleado acetonitrilo:agua como fase móvil. En la Figura 4 se muestra la comparación de los cromatogramas obtenidos en la separación de camptotecina según se utilicen fases estacionarias totalmente porosas o superficialmente porosas ("core-shell").

Como se aprecia en la Figura 4 al pasar de una fase estacionaria convencional a una fase superficialmente porosa, utilizando análogas condiciones de separación, el tiempo de retención de la camptotecina se reduce entre 3,5 y 4 veces con respecto a las fases estacionarias convencionales y sin que se sacrifique la eficacia de la separación. La reducción del tiempo de análisis significa un considerable ahorro de tiempo y de disolventes orgánicos, logrando unas separaciones cromatográficas sostenibles al economizar en la generación de residuos y en el consumo energético.

Las separaciones de compuestos básicos (por ejemplo, alcaloides) por HPLC continúan presentando ciertas dificultades, como asimetría de los picos cromatográficos, mostrando "colas" debido a la adsorción de los compuestos básicos sobre los grupos silanol libres

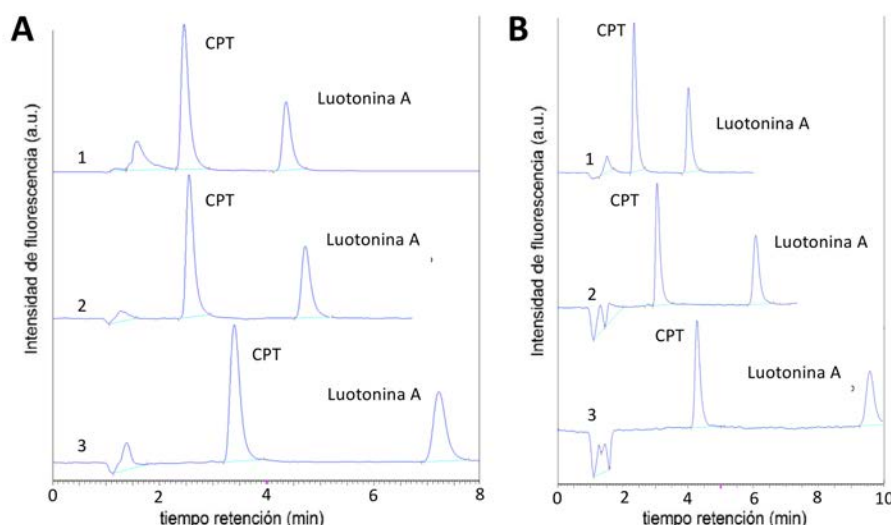


Figura 5. Cromatogramas obtenidos en las separaciones de camptotecina y luotonina A en fases estacionarias C18 de partículas de sílice totalmente porosa y empleando líquidos iónicos, ILs, como aditivos en las fases móviles (A) cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolinio, y (B) cloruro de 1-butil-1-metil-pirrolidinio. Caudal. 0,5 mL/min. Fases móviles: (1) agua : acetonitrilo; 60:40; v:v; (2) tampón acuoso de acetato amónico 10 mM (pH 3,0): acetonitrilo; 60:40; v:v conteniendo IL en concentración 20 mM; (3) tampón acuoso de acetato amónico 10 mM (pH 3,0): acetonitrilo; 60:40; v:v conteniendo IL en concentración 30 mM.



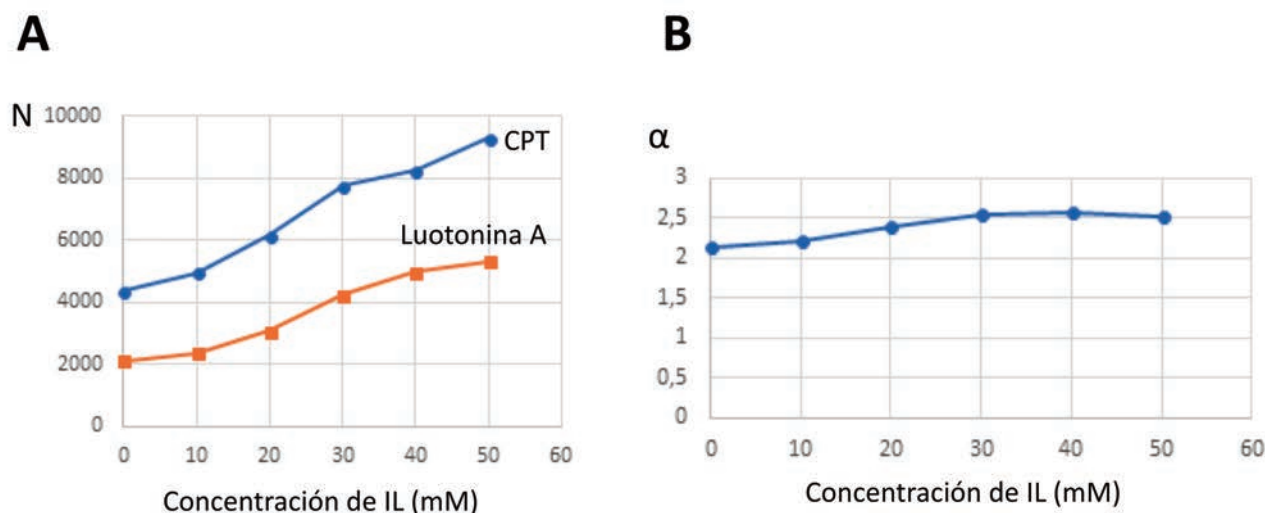


Figura 6. Comportamiento de la eficacia y de la selectividad de las separaciones empleando cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolinio (IL) como aditivo en la fase móvil. (A) Variación de la eficacia, evaluada como número de platos teóricos  $N$ , en función de la concentración de IL en la fase móvil; y (B) Variación de la selectividad ( $\alpha$ ) en función de la concentración de IL en la fase móvil

de las sílices químicamente modificadas. Algunos modificadores de las fases móviles mejoran la eficacia de las separaciones debido a su adsorción sobre las fases estacionarias. Los líquidos iónicos se encuentran en el grupo de compuestos que pueden "bloquear" los grupos silanol. Estas interacciones con la fase estacionaria y también con los analitos en las fases móviles conllevan modificaciones en los tiempos de retención de los solutos (36, 37). En la Figura 5 puede apreciarse como en el caso de los líquidos iónicos utilizados, tanto el derivado imidazolinio como el pirrolidinio producen un aumento en el valor del tiempo de retención de la camptotecina y de la luotonina A. Además a medida que aumenta la concentración de las sales de imidazolinio y pirrolidinio el incremento en el tiempo de retención ( $t_R$ ) es mayor. El aumento en el tiempo de retención de estos solutos en presencia de líquidos iónicos, no tiene los efectos buscados respecto a la sostenibilidad de las fases móviles, ya que implica un incremento en el consumo de fase móvil.

La presencia de líquidos iónicos en la fase móvil conlleva una mejora significativa en la eficacia de las separaciones, evaluada como número de platos teóricos ( $N$ ), así al aumentar la concentración de ILs en la fase móvil el número de platos teóricos se duplica tanto para la camptotecina como para la luotonina A. Teniendo en cuenta esta mejora en la eficacia que se muestra en la Figura 6, se podría incrementar la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil para lograr tiempos de retención más cortos, sin embargo, ello supone un incremento en la proporción de disolvente orgánico lo cual nos aleja de nuevo del objetivo de diseñar separaciones cromatográficas sostenibles. Así, estas condiciones de separación con una proporción de disolvente acuoso ligeramente superior al empleado con las fases estacionarias tipo "core-shell", nos mantiene dentro de los objetivos de sostenibilidad buscados. En las separa-

ciones en las que se emplean ILs el papel más relevante en la separación lo ejerce el catión orgánico. En este caso se demuestra que esto es así, ya que los dos ILs estudiados presentan como anión cloruro, por tanto, las diferencias observadas en el tiempo de retención de la camptotecina y la luotonina A se deben a las interacciones del catión del IL en la fase móvil. Ambos cationes favorecen la retención de los analitos en la fase estacionaria aumentando también el factor de selectividad de la pareja de analitos (Figura 6).

En conclusión de las dos alternativas propuestas para mejorar la sostenibilidad de las separaciones por cromatografía de líquidos, el empleo de fases estacionarias de partículas superficialmente porosas reduce en casi un 50% el tiempo de análisis, el consumo de disolventes y los residuos generados. El empleo de líquidos iónicos como aditivos en las fases móviles mejora la eficacia de la separación pero no logra los objetivos de sostenibilidad de las separaciones. La combinación de fases estacionarias de sílice superficialmente porosa y fases móviles que incluyan líquidos iónicos como aditivos constituye un reto atractivo que podrá aunar una buena eficacia cromatográfica con un reducido consumo de disolventes y energía.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación al Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos CTQ2009-11312/BQU y RTI2018-097662-B-I00; así como a la Universidad Complutense de Madrid, Grupos de Investigación GR35/10-A-920234. FABL y FMSS agradecen la financiación de las Instituciones a las que pertenecen de sus respectivos países (Chile y Argentina) para su estancia en España.



## 5. REFERENCIAS

1. Bennett GD. "Green Chemistry as an Expression of Environmental Ethics". En Sharma SK, Mudhoo A. (Eds.) *Green Chemistry for Environmental Sustainability*, Boca Raton: CRC Press 2011.
2. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 Principles of Green Analytical Chemistry and the Significance Mnemonic of Green Analytical Practices. *Trac-Trend Anal Chem* 2013; 50: 78-84.
3. Keith LH, Gron LU, Young JL. Green analytical methodologies. *Chem Rev* 2007; 107: 2695-2708.
4. Olives AI, González-Ruiz V, Martín MA. Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis. *ACS Sustainable Chem. Eng* 2017; 5: 5618-5634.
5. Koel, M. Do we need Green analytical chemistry? *Green Chem* 2016; 18, 923—931.
6. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. *Green Analytical Chemistry*. *Trac-Trend Anal Chem* 2008; 27: 497-511.
7. Mahugo-Santana C, Sosa-Ferrera Z, Torres-Padrón ME, Santana-Rodríguez JJ. Application of new approaches to liquid-phase micro-extraction for the determination of emerging pollutants. *Trac-Trend Anal Chem* 2011; 30: 732-748.
8. Tobiszewski M, Mechlinska A, Zygmunt B, Namiesnik J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trac-Trend Anal Chem* 2009; 28: 943-951.
9. Kannaiah KP, Sugumaran A, Chanduluru HK, Rathinam S. Environmental impact of greenness assessment tools in liquid chromatography—A review. *Microchem J* 2021; 170: 106685- 106703.
10. Welch CJ, Brkovic T, Schafer W, Gong X. Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. *Green Chem* 2009; 11: 1232-1238.
11. Welch CJ, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X, Helmy R, Schafer W, Cuff J, Pirezada Z, Zhou L. Greening analytical chromatography. *Trac-Trend Anal Chem* 2010; 29: 667-680.
12. Kerton FM. *Alternative Solvents for Green Chemistry*. Cambridge: RSC 2009.
13. Garrigues S, Armenta S, de la Guardia M. Green strategies for decontamination of analytical wastes. *Trac-Trend Anal Chem* 2010; 29: 592-601.
14. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. Challenging core-shell stationary phases with the separation of closely related anti-cancer compounds: performance studies and application to drug quantitation in cell cultures with multi-well plate clean-up. *J Chromatogr A* 2014; 1364: 83-95.
15. De Vos J, Broeckhoven K, Eeltink S. Advances in Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography Technology and System Design. *Anal Chem* 2016; 88: 262-278.
16. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *Trac-Trend Anal Chem* 2015; 64: 17-28.
17. Tanaka N. Core—Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Chem* 2016; 88: 279-298.
18. Gumustas M, Zalewski P, Ozkan SA, Uslu B. The History of the Core—Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography. *Chromatographia* 2019; 82: 17-48.
19. Ahmed A, Skinley K, Herodotou S, Zhang H. Core—shell microspheres with porous nanostructured shells for liquid chromatography. *J Sep Sci* 2018; 41: 99-124.
20. Ordoñez, EY, Rodil R, Quintana JB, Cela R. Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Food Chem* 2015; 169: 162-168.
21. Yabré M, Ferey L, Somé IT, Gaudin K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis, *Molecules* 2018, 23, 1065-1090.
22. Haq N, Shakeel F, Alanazi F, Alshora FA, Ibrahim MA. Development and validation of a green RP-HPLC method for the analysis of rosuvastatin: a step towards making liquid chromatography environmentally benign. *Green Process Synth* 2018; 7: 160-169.
23. García-Alvarez-Coque MC, Ruiz Ángel MJ, Peris-García E. *Liquid chromatography | Micellar Liquid Chromatography*. Academic Press, 2019.
24. García-Alvarez-Coque MC, Ruiz Ángel MJ, Cardá Broch S. *Micellar liquid chromatography: fundamentals*. In Anderson JL, Berthod A, Pino V, Stalcup AM. *Analytical Separation Science*. Vol. 2. Wiley-VCH, 2015.
25. González-Ruiz V, León AG, Olives AI, Martín MA, Menéndez JC. Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives. *Green Chem.*, 2011, 13, 115-126.
26. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. SPE/RP-HPLC using C1 columns: an environmentally friendly alternative to conventional reverse-phase separations for quantitation of beta-carboline alkaloids in human serum samples. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400: 395-401.
27. García-Alvarez-Coque MC, Ruiz Ángel MJ, Berthod A, Cardá Broch S. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. *Anal Chim Acta* 2015; 883: 1-21.
28. Peris-García E, García-Alvarez-Coque MC, Cardá Broch S, Ruiz Ángel MJ. Effect of buffer nature and concentration on the chromatographic performance of basic compounds in the absence and presence of 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride. *J Chromatogr A* 2019; 1602: 397-408.





29. Sun P, Armstrong DW. Ionic liquids in analytical chemistry. *Anal Chim Acta* 2010; 661: 1-16.
30. Buszewska-Forajta M, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Free silanols and ionic liquids as their suppressors in liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2018; 1559: 17-43.
31. Ali I, Suhail M, Sanagi MM, Sanagi HY. Ionic Liquids in HPLC and CE: A Hope for Future. *Crit Rev Anal Chem* 2017; 47: 332-339.
32. Ubeda-Torres MT, Ortiz-Bolsico C, García-Álvarez-Coque MC, Ruiz-Angel MJ. Gaining insight in the behaviour of imidazolium-based ionic liquids as additives in reversed-phase liquid chromatography for the analysis of basic compounds. *J Chromatogr A* 2015; 1380: 96-103.
33. Di Nunzio M, Cohen B, Douhal A. Structural photodynamics of camptothecin, an anticancer drug in aqueous solutions. *J Phys Chem A* 2011; 115: 5094-5104.
34. González-Ruiz V, Mussardo P, Corda E, Girotti S, Olives AI, Martín MA. Liquid chromatographic analysis of the anticancer alkaloid luotonin A and some new derivatives in human serum samples. *J Sep Sci* 2010; 33: 2086-2093.
35. González-Ruiz V, Cores A, Martín-Cámara O, Orellana K, Cervera-Carrascón V, Michalska P, Olives AI, León R, Martín MA, Menéndez JC. Enhanced Stability and Bioactivity of Natural Anticancer Topoisomerase I Inhibitors through Cyclodextrin Complexation. *Pharmaceutics* 2021; 13: 1609-1618.
36. Berthod A, Ruiz-Angel MJ, Carda-Broch S. Ionic liquids in separation techniques. *J Chromatogr A*, 2008; 1184: 6-18.
37. Han D, Row KH. Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules*, 2010; 15: 2405-2426.

Si desea citar nuestro artículo:

**Alternativas sostenibles en cromatografía de líquidos.  
Aplicaciones en la determinación de fármacos**

María Antonia Martín, Felipe Andrés Bravo-Lambie,  
Fresia Melina Silva-Sofrás, María del Mar Caja y Ana Isabel Olives.  
*An Real Acad Farm* (Internet].

*An. Real Acad. Farm.* Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 445-453

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.12>



# INICIACIÓN A LA TOXICOCINÉTICA DESDE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA: UN EJEMPLO DE COLABORACIÓN ACADÉMICA

## INTRODUCTION TO TOXICOKINETICS FROM THE ROYAL NATIONAL ACADEMY OF PHARMACY: AN EXAMPLE OF ACADEMIC COLLABORATION

**Bartolomé Ribas Ozonas, Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, José Martínez Lanao**

Académicos de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** jmlanao@usal.es

### ARTÍCULO

### RESUMEN

El presente trabajo aborda el inicio de la toxicocinética en España por el grupo del Prof. Bartolomé Ribas en los años 60 del siglo pasado, así como la colaboración interdisciplinar que se produce entre académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) y más concretamente con el grupo del Prof. Rafael Cadórniga, que fue pionero de los estudios de Biofarmacia y Farmacocinética en España. Dicha colaboración científica constituye un magnífico ejemplo del trabajo interdisciplinar entre académicos así como de la fuerte interrelación entre la toxicocinética y la farmacocinética. El trabajo también desarrolla los conceptos, métodos y avances en toxicocinética, incidiendo en los métodos analíticos para la determinación de muy bajas concentraciones de sustancias tóxicas en el organismo animal y humano, los modelos multicompartimentales, los modelos toxicocinéticos con base fisiológica (PBTK), los modelos toxicocinéticos/toxicodinámicos (TX/TD), los modelos poblacionales los métodos bayesianos en toxicocinética así como el futuro de esta disciplina basado también en el uso de metodologías basadas en la inteligencia artificial. Actualmente la toxicocinética juega un papel fundamental en el desarrollo de nuevos medicamentos, así como en la evaluación de la seguridad alimentaria y de los riesgos medioambientales.

### ABSTRACT

*This paper addresses the beginning of toxicokinetics in Spain by the group of Prof. Bartolomé Ribas in the 60s of the last century, as well as the interdisciplinary collaboration that occurs between academics of the Royal National Academy of Pharmacy (RANF) and more specifically with the group of Prof. Rafael Cadórniga, who was a pioneer of Biopharmacy and Pharmacokinetics studies in Spain. This scientific collaboration is a magnificent example of interdisciplinary work between academics as well as the strong interrelationship between toxicokinetics and pharmacokinetics. The work also develops the concepts, methods and advances in toxicokinetics, focusing on analytical methods for the determination of very low concentrations of toxic substances in the animal and human organism, multicompartimental models, physiologically based toxicokinetic models (PBTK), toxicokinetic / toxicodynamic models (TX / TD), population models, Bayesian methods in toxicokinetics as well as the future of this discipline also based on the use of methodologies based on artificial intelligence. Currently, toxicokinetics plays a fundamental role in the development of new medicines, as well as in the evaluation of food safety and environmental risks.*

#### Palabras Clave:

toxicocinética  
farmacocinética  
RANF  
colaboración académica

#### Keywords:

toxicokinetics  
pharmacokinetics  
RANF  
academic collaboration



## 1. INTRODUCCIÓN

En el antiguo colegio de Fonseca, en Santiago de Compostela, coincidieron, en los años 50 del siglo pasado, dos jóvenes farmacéuticos que llegarían a ser destacados científicos y respetados miembros de la Real Academia Nacional de Farmacia: Rafael Cadórniga Carro y Bartolomé Ribas Ozonas. Ambos desarrollaron una brillante trayectoria profesional comprometida con el cuidado de la salud y la prevención de la enfermedad. Como investigadores, compartieron su entusiasmo por la mejora de la terapéutica farmacológica y la salud pública, objetivos prioritarios de la práctica de la Farmacia en el siglo XXI. Como académicos, su trabajo fue reconocido por los miembros de la Corporación y ambos ocuparon cargos de responsabilidad en la Junta de Gobierno. El Dr. Rafael Cadórniga ocupó la presidencia (1992-1997) y el Dr. Bartolomé Ribas fue Secretario General (2012-2017). En la década de los años 80 del siglo pasado, ambos académicos inician una intensa colaboración científica en el campo de la toxicocinética de metales pesados que se refleja en diversas publicaciones científicas internacionales y que sienta los cimientos de esta disciplina en España.

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los avances de la toxicocinética en las últimas décadas, a la vez que profundizar en los inicios de esta disciplina en España, lo que constituye un magnífico ejemplo de la colaboración entre grupos y a su vez de la colaboración científica entre académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF).

## 2. TRAYECTORIA DE RAFAEL CADÓRNIGA: EVOLUCIONANDO HACIA LA FARMACOCINÉTICA

Rafael Cadórniga Carro (1927-1999) fue catedrático de Farmacia Galénica en las Facultades de Farmacia en las Universidades de Santiago de Compostela y Complutense de Madrid. Con una sólida formación físico-química, el Dr. Cadórniga inició sus investigaciones estudiando las propiedades superficiales de los agentes tensoactivos y su capacidad para formar micelas coloidales (1). Pronto intuyó la posible aplicación de estas estructuras al diseño de formulaciones de liberación modificada de fármacos. En efecto, las asociaciones entre tensoactivos aniónicos y ciertos fármacos catiónicos modificaba el proceso de absorción, incrementando su biodisponibilidad, cuando se administraban por vía oral. Pronto surgió la necesidad de confirmar el comportamiento de estas asociaciones en modelos experimentales para evaluar las consecuencias del aumento de la biodisponibilidad. El diseño y desarrollo de los *Drug Delivery Systems* continua siendo en la actualidad un área importante para la investigación farmacéutica. A finales de los años 60 el Dr. Cadórniga analiza el concepto de "availability" por

primera vez en la bibliografía española, término que acabaría denominándose "biodisponibilidad". Los estudios "*in-vitro in-vivo*" llevaron al Prof. Cadórniga a establecer el concepto de "caducidad biofarmacéutica" que se incorporó posteriormente a los criterios de calidad en la producción industrial de medicamentos (2).

El estudio de los factores que modifican la biodisponibilidad despertó el interés del Prof. Cadórniga por la farmacocinética. Por sus conocimientos en cinética química resolvió con facilidad la aplicación de modelos matemáticos para la caracterización de los parámetros farmacocinéticos, especialmente el aclaramiento y el área bajo la curva de concentraciones en sangre. Sus comentarios sobre la variabilidad intra e interindividual se produjeron con anterioridad a los enunciados por el Prof. Lewis B. Sheiner en la Universidad de San Francisco que permitieron, posteriormente, el desarrollo de la farmacocinética de poblaciones (3).

La incorporación del Prof. Cadórniga al Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela como Jefe de Servicio de Farmacia Hospitalaria facilitó, sin duda, la colaboración con diferentes especialistas médicos y muy especialmente con el Prof. José Peña Guitián, catedrático de Pediatría, con el que inició los programas de Farmacocinética Clínica. Estos programas se dirigieron, en principio, a mejorar la calidad del tratamiento en niños epilépticos, ampliándose posteriormente a otras áreas de la terapéutica farmacológica.

El Prof. Rafael Cadórniga ingresó, como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia el 14 de Abril de 1983. Su discurso de ingreso titulado "Vigencia de la educación farmacéutica. Posible proyección a un futuro" recoge su experiencia como docente e investigador manifestando las necesidades de un cambio en los estudios de Farmacia que ya eran una realidad en los Estados Unidos y en los países más adelantados de Europa. Esta concepción de la farmacia fue anticipada por el Dr. Gerard Levy, profesor de ciencias farmacéuticas en la Universidad de Buffalo (New York). En 1980 publicó en la revista *Pharm Inter* las nuevas exigencias que se requerían para la formación de los futuros farmacéuticos que incorporaban, entre otras disciplinas, la Biofarmacia y la Farmacocinética (4).

El Prof. Cadórniga fue un pionero en el campo de la Biofarmacia y Farmacocinética y contribuyó decisivamente en la incorporación de estas disciplinas en los planes de estudio de la licenciatura de Farmacia. Esta aportación ha sido reconocida en todo el ámbito sanitario, como recordaba, con especial sensibilidad, en un homenaje celebrado en el Ministerio de Sanidad, uno de sus buenos amigos, el ilustre farmacólogo y miembro de la Academia, el Prof. Juan Tamargo Menéndez. En el mismo sentido se pronunciaron los ponentes que participaron en la sesión necrológica organizada por la Real Academia Nacional de Medicina el 26 de Octubre



de 1999. En este acto académico, el Prof. Espinos Pérez, catedrático de Patología Médica y miembro de la Corporación, señalaba: "Gracias al extraordinario perfeccionamiento en la metodología analítica y sus conocimientos de informática, el Prof. Cadórniga contribuyó decisivamente al desarrollo de la Farmacocinética tanto en la docencia como en la investigación farmacéutica". En 1984 el Prof. Cadórniga recibía la medalla de honor del *Scientific Committee of European Congress of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, en reconocimiento a sus importantes contribuciones que forman ya parte de la historia de estas disciplinas (5).

Durante más de 20 años el Dr. Cadórniga colaboró estrechamente con investigadores españoles y extranjeros de reconocido prestigio como los doctores D. Breimer, J. Hirtz, W. Rischel, L. Zatureski, etc., quienes le tuvieron especial aprecio personal. Su escuela, iniciada en la Universidad de Santiago hace 70 años se extendió pronto a otras universidades españolas donde jóvenes profesores universitarios e investigadores de la cuarta generación están hoy en la vanguardia de la investigación en las áreas de tecnología farmacéutica, biofarmacia y farmacocinética.

### 3. TRAYECTORIA DE BARTOLOMÉ RIBAS. LOS INICIOS DE LA TOXICOCINÉTICA EN ESPAÑA

El Prof. Ribas Ozonas completó su formación en París como becario estudiando técnicas fisiológicas y farmacológicas, radiobiología y utilización de radioelementos lo que tendría gran influencia en su brillante carrera como investigador incorporado a centros oficiales como el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Instituto de Salud Carlos III, donde ocupó la plaza de Jefe de Área de Toxicología.

La actividad investigadora del Prof. Ribas se desarrolló principalmente en el campo de la toxicología analítica, estudiando el comportamiento de los metales pesados desde un punto de vista sanitario. Su preocupación por los efectos tóxicos de estas sustancias fue para él una prioridad en toda su carrera profesional. Los metales pesados ingresan en el organismo por diferentes vías como el agua, el aire, los alimentos y, ocasionalmente, la exposición cutánea. Una vez que alcanzan la circulación sistémica se distribuyen en diferentes órganos y tejidos, alcanzando, incluso, el sistema nervioso central. Cuando la exposición es crónica se llega a producir una acumulación, que se asocia a efectos tóxicos con variedad de manifestaciones. Los metales pesados alteran diferentes mecanismos celulares afectando al crecimiento, diferenciación, procesos de reparación y apoptosis. Algunos metales pesados pueden producir alteraciones epigenéticas que afectan a la expresión de los genes. Los mecanismos de acción son similares en los metales pesados, incluyendo generación de ROS, destrucción de las defensas antioxidantes, inhibición enzimática y stress oxidativo (6).

El Dr. Ribas Ozonas ingresa en la Real Academia Nacional de Farmacia el 5 de Abril de 1990 con el discurso titulado "Tóxicos metálicos y búsqueda de nuevos marcadores" (7). En su exposición recurre a la denominación de tóxicos metálicos en línea con las nuevas tendencias que se inclinan por el cambio de metales pesados. En una reciente publicación en el *International Journal of Environmental and Public Health*, se afirma "para ser consecuente los investigadores deberían utilizar correctamente las definiciones aceptadas. La serie V a Zn son considerados metales de transición, As es un metaloide, Se es un no metal y Ba es un alcalinotérreo. La denominación de metales pesados se ha puesto en cuestión estos últimos años a pesar de que su uso es habitual en la bibliografía internacional. La principal razón es que debería recurrirse a una expresión que haga referencia a su importancia química y biológica. Por ello varios autores han propuesto considerarles "elementos potencialmente tóxicos" que es una denominación más acertada para estos elementos químicos, muchos de los cuales son responsables de graves intoxicaciones (8).

A partir de 1960 el Prof. Ribas Ozonas inicia sus publicaciones sobre la exposición de metales pesados como el cinc, níquel, rubidio, cadmio, etc., en animales de laboratorio. Sus principales objetivos fueron conocer la absorción oral de algunos de estos elementos, caracterizar su distribución tisular y valorar las consecuencias de su acumulación cuando los animales estaban expuestos a administraciones prolongadas o a sobredosificación. Además, trató de establecer posibles relaciones entre la acumulación tisular y los efectos tóxicos en los animales. Un buen ejemplo fue la relación de los efectos neurológicos de cadmio y níquel con la acumulación en estructuras cerebrales (9-12).

En algunas de estas publicaciones figura como coautor el Prof. Santos Ruiz, insigne farmacéutico, catedrático y destacado miembro de esta Real Academia de la que fue director (1976-1991). El Dr. Ribas se incorporó temporalmente a la cátedra de Bioquímica que gozaba de gran prestigio en la Universidad Complutense. A finales de los años 70 se incorpora como coautora la Dra. Sainz Vadillo, colaboradora del Prof. Cadórniga, lo que refleja el inicio de la colaboración con la cátedra de Farmacia Galénica de la Universidad Complutense (13-14).

### 4. IMPORTANCIA DE LA COLABORACIÓN INTERDISCIPLINAR

En octubre de 1975 el Prof. Rafael Cadórniga toma posesión como nuevo catedrático de Farmacia Galénica en la Universidad Complutense de Madrid. Sustituye en el cargo a otro ilustre miembro de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Prof. Eugenio Sellés Martí (1904-1997) con motivo de su jubilación. A comienzos de 1976 se produce el reencuentro entre los Dres. Cadórniga y Ribas después de 25 años de un trabajo intenso y pro-



ductivo en las aulas y laboratorios. El Dr. Ribas acudió al encuentro con el Dr. Cadórniga por sus conocimientos sobre farmacocinética para aplicar los tratamientos matemáticos al estudio de la exposición de animales de laboratorio a diferentes metales pesados. Para el Prof. Ribas era de interés caracterizar correctamente los procesos de absorción, distribución y eliminación de estos elementos tóxicos. Ello le permitiría establecer relación entre la bioacumulación y los efectos tóxicos que afectaban a órganos y tejidos, como, por ejemplo, las alteraciones neurológicas o metabólicas. El reencuentro de estos dos científicos permitió establecer las bases para una investigación interdisciplinar sobre toxicocinética de los metales pesados en modelos experimentales. Aunque los progresos en los métodos analíticos y en los sistemas de cálculo en los parámetros que definen la exposición han cambiado radicalmente debe destacarse esta colaboración entre dos destacados miembros de la Real Academia Nacional de Farmacia hace más de 40 años.

El primer trabajo firmado por los Doctores Ribas y Cadórniga se publica en la Revista Española de Fisiología en 1984 aunque con anterioridad se habían presentado varias comunicaciones en congresos nacionales e internacionales. El trabajo, titulado "Farmacocinética del cadmio-109 en sangre y en estructuras cerebrales de rata" se ocupó del cálculo de los parámetros farmacocinéticos de este radionuclido aplicando modelos compartimentales (15). Los valores experimentales medidos con un contador gamma Packar 5110 se ajustaron a un modelo bicompartimental abierto, que permiten caracterizar con precisión la curva bioexponencial obtenida tras la administración, por vía intravenosa de una dosis de 20  $\mu$ Ci de cadmio-109. La posible asociación de ciertos efectos neurológicos del cadmio y su capacidad de acceso al sistema nervioso central se estudió su distribución en estructuras cerebrales como hipotálamo, mesencéfalo, cerebelo, etc. Después de la administración intracerebroventricular se comprueba la permanencia del Cd en el compartimento cerebral, existiendo un intercambio entre las estructuras cerebrales y el líquido cefalorraquídeo. Con esta publicación se inició formalmente la colaboración interdisciplinar en el campo de la farmacocinética, siendo la Real Academia de Farmacia el punto de encuentro entre ambos científicos. En los años siguientes continuó la colaboración interdisciplinar en las que intervinieron los equipos del Prof. Cadórniga y del Prof. Ribas. Se ampliaron los estudios toxicocinéticos a otros metales pesados responsables de intoxicaciones en humanos y en diversas especies animales. Entre ellos destacan el Níquel, Rubidio, Zinc, etc. Los resultados de esta investigación se presentaron en congresos nacionales y extranjeros publicándose posteriormente (16-19).

Los estudios toxicológicos permiten conocer los efectos adversos de los productos químicos sobre órganos diana y predecir variables tan importantes como la capacidad de acumulación o la

relación dosis-respuesta. Para conocer la toxicidad se requieren ensayos recurriendo a animales de laboratorio como modelos experimentales. Además deben seguirse protocolos estrictos para evitar el sufrimiento de estos modelos animales como exigen las normas establecidas por numerosos organismos e instituciones científicas.

El Dr. Ribas Ozonas es consciente de las posibilidades que ofrecen los modelos animales en los estudios toxicológicos y del control al que deben estar sometidos estos experimentos, como se recoge en este párrafo: "En ausencia de datos en humanos, la investigación con animales de experimentación es el método más fiable para detectar los efectos tóxicos más importantes que producen las sustancias químicas y para predecir los riesgos para los humanos y para la salud ambiental".

A pesar de la gran utilidad de estos ensayos desde el siglo XIX se ha producido un intenso debate sobre la conveniencia de su uso indiscriminado. El conocido principio de las tres erres (reemplazo, reducción y refinamiento) fue enunciado por primera vez en el libro *Principles of Humane Technique* publicado en 1959 y considerado en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (texto pertinente a efecto del EEE). Todo ello ha llevado a promocionar la investigación toxicológica por métodos alternativos.

La Asociación Española de Toxicología se adhiere al "Acuerdo de Transparencia en experimentación animal promovido por la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE)" en colaboración con la Asociación Europea para la investigación animal publicado en 2016. El documento reconoce el papel relevante de la investigación en modelos experimentales en el área de la salud y particularmente en el progreso de la Medicina. Sin el uso de animales no tendríamos de la mayoría de medicamentos, incluidas vacunas, así como de determinadas técnicas quirúrgicas que se aplican en medicina humana y veterinaria.

Los principales métodos alternativos recurren a diferentes estrategias, siendo las más relevantes: a) utilizar organismos tales como bacterias, hongos, plantas o invertebrados que sustituyen, en los experimentos, a los animales de laboratorio; b) utilizar modelos matemáticos *in silico* para la predicción e integración de los datos; c) utilizar embriones en las etapas iniciales de peces, anfibios, reptiles y mamíferos; d) recurrir a métodos *in vitro*: órganos y cultivos celulares, estrategias de experimentación integrada (*Integrated Texturing Strategies*).

El profesor Ribas recoge en su discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia y en algunas de sus publicaciones de los años 80 aportaciones en la búsqueda de marcadores para los metales pesados de interés toxicológico. Así analiza los posibles marcadores para evaluar la nefrotoxicidad y discute la





evolución de los resultados analíticos para la separación de proteínas en la orina de los animales, desde las técnicas clásicas como la filtración o la cromatografía a las últimas técnicas instrumentales. Debemos también destacar sus experiencias con la metalotioneína asociada con la intoxicación por cadmio. El Dr. Ribas detalla sus experiencias con la cromatografía líquida de alta eficacia en la evaluación de las isometalotioneínas para su aplicación en toxicología. Sin duda se estaba acercando a los biomarcadores de exposición que serían fundamentales para los estudios toxicocinéticos (7).

El Instituto Nacional de la Salud de EE.UU. define al biomarcador como "aquella característica que puede ser medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal o una respuesta farmacológica a un agente terapéutico. Ejemplos bien conocidos son la medida de la filtración glomerular o de la presión sanguínea". Posteriormente esta definición se extiende al uso de agentes tóxicos para los seres vivos como los metales pesados y diferentes contaminantes del medio ambiente. El Dr. Ribas en sus investigaciones sobre la exposición a metales pesados expresaba, en los años sesenta la siguiente reflexión: "Se necesita con urgencia disponer de biomarcadores de exposición a tóxicos en dosis subclínicas y a aquellas dosis que actualmente estamos recibiendo en nuestras dietas e inhalando en nuestra atmósfera. Ello nos permitirá no solo conocer la sintomatología o la patogenia sino también detectar a nivel molecular las modificaciones previas a los mecanismos de regulación homeostática" (20-21).

Actualmente los biomarcadores se agrupan en: biomarcadores de exposición, biomarcadores de efecto y biomarcadores de susceptibilidad. Los primeros son sustancias exógenas o sin metabolitos o una interacción entre un agente xenobiótico y alguna diana molecular o celular.

El desarrollo de las técnicas analíticas ha permitido medir con exactitud y precisión cantidades muy bajas de los contaminantes potencialmente tóxicos, como los metales pesados. En definitiva, las concentraciones en fluidos biológicos y tejidos permiten predecir la posible toxicidad de los metales pesados, uno de los objetivos de la toxicocinética.

Mejorar la seguridad de los procesos de fabricación ha sido un objetivo prioritario para muchos sectores industriales como la minería, las fundiciones, la metalurgia, etc. Los accidentes y demandas laborales por contaminación llegaban a afectar a la economía de las empresas lo que obligó a tomar medidas correctoras en los manuales de procedimiento. Aunque la iniciación de los programas de seguridad se inician con la revolución industrial, su impulso definitivo se asocia con la revuelta de Chicago en 1886 con las reivindicaciones laborales de trabajo. A principios del siglo XX la Universidad de Harvard ofrece la primera licenciatura en Seguridad e

Higiene en el Trabajo, se crean la Organización Internacional del Trabajo (OTI) y el Servicio de Prevención de Accidentes en Europa. Antes de 1950 toda esta actividad se convierte en una ciencia dedicada a minimizar los riesgos en el trabajo ante los nuevos procesos industriales. Lamentablemente los programas de mejora de la seguridad en la salud se establecieron con retraso en relación con los sectores industriales y muchas empresas de servicios.

La ciencia, la tecnología y la innovación han adquirido un gran desarrollo en los últimos años y se ha convertido en un determinante fundamental para el crecimiento y la competitividad. En el área de la salud este crecimiento se ha reflejado en una reducción de la morbilidad de las enfermedades y una mejora en la calidad de vida de aquellos pacientes con enfermedades crónicas.

En los proyectos de I + D + I se habla ampliamente de conceptos como la investigación multidisciplinar o investigación interdisciplinar. De hecho en el Horizonte Europa: un nuevo programa marco de la Unión Europea (2021-2027) hace especial incidencia en los programas de colaboración entre instituciones, equipos e investigadores.

La investigación entre disciplinas es hoy imprescindible para poder avanzar en el progreso científico y en el desarrollo tecnológico. Los científicos de las diferentes disciplinas deben plantearse nuevos retos y reconocer la necesidad de progresar frente a ellos a través de una investigación entre disciplinas bien sean multidisciplinar o interdisciplinar. La investigación multidisciplinar se aplica cuando los investigadores de diferentes disciplinas trabajan de forma independiente en un problema para una investigación común. Los investigadores permanecen dentro de su área y modelos a la investigación pero la abordan desde la perspectiva de la propia disciplina. Los resultados de la investigación, en este caso son complementarios entre sí.

La *National Science Foundation* define la investigación interdisciplinar como "una forma de investigación de individuos o equipos que integra información, datos, técnicas, herramientas, perspectivas, conceptos y teorías de dos o más disciplinas. Comprender o resolver problemas cuyas soluciones están más allá del alcance de una sola disciplina o área de investigación. Durante décadas la investigación interdisciplinar presentó dificultades para su desarrollo. Las denominadas "islas de investigación" eran habituales tanto en universidades como en centros de investigación.

Desde la perspectiva individual el trabajo interdisciplinario requiere mentes abiertas dispuestas a permitir lo nuevo, actitud para ir más allá del área de interés personal tradicional y aceptar la irrupción de lo diferente incluso al interior de lo que se considera de dominio propio.

La asociación del Prof. Cadórniga y el Prof. Ribas, desti-



nada a progresar en el conocimiento de la toxicocinética de metales pesados en modelos experimentales, merece ser destacada por varios motivos:

- a. Esta asociación se produce hace más de 40 años cuando los investigadores trabajaban en condiciones precarias y con escaso apoyo institucional. Los intercambios de investigadores eran escasos y casi siempre se trataba de iniciativas personales.
- b. Se trata de un buen ejemplo de asociación en el que se progresa con dos disciplinas que en aquellos momentos tienen escaso arraigo en los estudios de Farmacia en España.
- c. La asociación estaba dirigida por dos ilustres farmacéuticos miembros de la Real Academia Nacional de Farmacia que alcanzaron cargos representativos en nuestra Corporación.

Finalmente, es interesante recordar las palabras de la Dra. Elizabeth H. Blackburn, especialista en Bioquímica y Premio Nobel de Medicina en 2009 por sus estudios sobre la telomerasa: "Una de las cosas realmente interesantes de investigar es la interdisciplinariedad. Hace unos años nunca hubiera pensado en la posibilidad de colaborar con psicólogos. Si hace diez años me hubieras dicho que estaría pensando seriamente en la meditación, hubiera dicho que uno de los dos estaba loco" (22).

## 5. TOXICOCINÉTICA: CONCEPTOS Y ESTADO ACTUAL

Actualmente está adquiriendo una gran importancia la evaluación de riesgos toxicológicos, no solo por parte de componentes individuales como pesticidas, metales pesados, etc. sino también de mezclas de compuestos. Todo ello hace que cada vez adquiera más importancia el conocimiento de los procesos cinéticos y de acumulación de tóxicos a través de la toxicocinética así como sus efectos, tanto en el hombre por exposición a ciertos xenobióticos, como en especies animales sometidas a riesgos medioambientales (23,24).

Se define la toxicocinética como el conjunto de procesos de ADME, es decir absorción, distribución, metabolismo y excreción de sustancias tóxicas en el organismo. La toxicocinética juega por lo tanto un papel relevante en la evaluación de la disposición y acumulación de sustancias tóxicas, así como en la respuesta del organismo a estos agentes a través de una disciplina complementaria denominada toxicodinámica. Los fundamentos de la toxicocinética hay que buscarlos en la farmacocinética, con la que guarda una fuerte relación y con la que comparte objetivos y métodos de trabajo.

La toxicocinética juega un papel fundamental en el marco de los estudios toxicológicos, complementariamente a otras áreas de estudio como Genotoxicidad, Toxicidad (subcrónica y crónica),

carcinogénesis, toxicología reproductiva, inmunotoxicidad, etc.

En el hombre, la toxicocinética puede considerarse como una rama dentro de la toxicología clínica que constituye una especialidad médica orientada al diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones. Las implicaciones actuales de la toxicocinética son muy numerosas en campos como el desarrollo de fármacos, toxicología reproductiva o la toxicocinética de metales pesados, entre otros (25,26). La toxicocinética tiene impacto en la nanomedicina a través de la evaluación de la toxicidad hepática de sistemas nanoparticulares (27).

Las publicaciones en el campo de la toxicocinética son numerosas a nivel internacional, especialmente desde los años 90. En España los primeros trabajos de toxicocinética sobre metales pesados se publican por parte del grupo del profesor Bartolomé Ribas de la Universidad Complutense, en los años 80 y 90 del siglo pasado, algunos de ellos en colaboración con el grupo de profesor Rafael Cadórniga ya mencionadas en este artículo (16, 17, 18). Posteriormente se han realizado interesantes aportaciones en este campo por parte de otros grupos españoles (28, 29, 30).

### 5. 1. Avances en toxicocinética

Las bases científicas de la toxicocinética hay que buscarlas en la farmacocinética, considerando que muchos de los métodos y modelos que se utilizan para evaluar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, como los modelos *in silico*, los modelos compartimentales y fisiológicos, la cinética de poblaciones o la estadística bayesiana, entre otros, se aplican en la actualidad para el análisis de datos toxicocinéticos.

### 5. 2. Avances analíticos en estudios toxicocinéticos

La determinación de niveles plasmáticos y tisulares de xenobióticos y otros elementos potencialmente tóxicos, habitual en el campo de la toxicocinética, requiere la utilización de técnicas analíticas específicas y sensibles, que permiten determinar con precisión los niveles de estas sustancias y sus metabolitos. Estos métodos pueden utilizarse en estudios de extrapolación cuantitativa *in vitro in vivo* (QIVIVE por sus siglas en inglés) y especialmente en estudios toxicocinéticos de disposición de elementos potencialmente tóxicos que requieren la cuantificación de estas sustancias en plasma y en diversos tejidos, tanto en especies animales como en el hombre (31,32).

Considerando las bajas concentraciones de sustancias tóxicas en sangre y tejidos, se requieren técnicas analíticas altamente sensibles y precisas para su cuantificación en tejidos y fluidos biológicos. La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de espectrometría de masas (LC-MS por sus siglas en inglés) constituye una de las técnicas analíticas más interesantes ya

que permite conseguir una alta especificidad y gran sensibilidad en la cuantificación de concentraciones muy bajas de tóxicos en diferentes tipos de matrices (32,33). Paralelamente, el desarrollo y validación de métodos analíticos siguiendo normativa internacional ICH/FDA, bajo un sistema de calidad, como las buenas prácticas de laboratorio (GLP por sus siglas en inglés) permite cubrir este objetivo (34).

### 5.3. Modelos *in silico*

Se han realizado diversos avances en las etapas de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, a través de modelos *in silico* para la predicción de propiedades farmacocinéticas de nuevos compuestos (ADME) y su relación con la toxicidad (ADME/Tox) (35,36,37).

Recientemente, modelos *in silico* basados en la inteligencia artificial mediante técnicas de *Machine learning* han sido utilizados para predecir el comportamiento toxicocinético de 65 compuestos de diferentes clases utilizando un modelo farmacocinético/toxicocinético con base fisiológica (36).

También se ha prestado atención al impacto de proteínas transportadores de fármacos y sus polimorfismos en la toxicocinética y la toxicidad de pesticidas. Estudios *in vitro* combinados con métodos *in silico*, han demostrado que algunos pesticidas modulan la actividad y la expresión de transportadores de fármacos así como la relevancia *in vivo* de este tipo de interacciones en el hombre, cuando ha sido expuesto a sustancias contaminantes presentes en el medio ambiente (38).

### 5.4. Modelos compartimentales

El análisis cinético de la acumulación de sustancias tóxicas en el organismo animal o humano se ha reflejado en diversas publicaciones que recurren al análisis farmacocinético convencional, basado en la utilización de modelos compartimentales y fisiológicos, para evaluar el comportamiento toxicocinético de diferentes compuestos y que permite, entre otras aplicaciones, la evaluación de riesgos medioambientales en diferentes ecosistemas (39,40). La Figura 1 muestra la aplicación de diferentes tipos de modelos toxicocinéticos, principalmente compartimentales y fisiológicos para la evaluación de riesgos medioambientales producidos por sustancias químicas (41).

Se han propuesto diferentes tipo de modelos toxicocinéticos multicompartimentales para caracterizar la disposición de diferentes sustancias tóxicas. La toxina Tricoteceno-2 (T-2) es una micotoxina producida por especies de *Fusarium* que puede suponer un grave riesgo para la salud animal y humana. Un modelo tri-compartimental toxicocinético que considera rápida y lenta metabolización ha sido utilizado para caracterizar la disposición de la toxina T2 en gambas tras su administración por vía intramuscular (39).

También se han utilizado modelos toxicocinéticos multicompartimentales para caracterizar la bioacumulación y el metabolismo de diferentes antibióticos en el pepino de mar. Considerando la anatomía de los pepinos de mar el modelo considera cinco compartimentos, pared del cuerpo, boca, árboles respiratorios, tracto digestivo y líquido celómico como se observa en la Figura 2. El

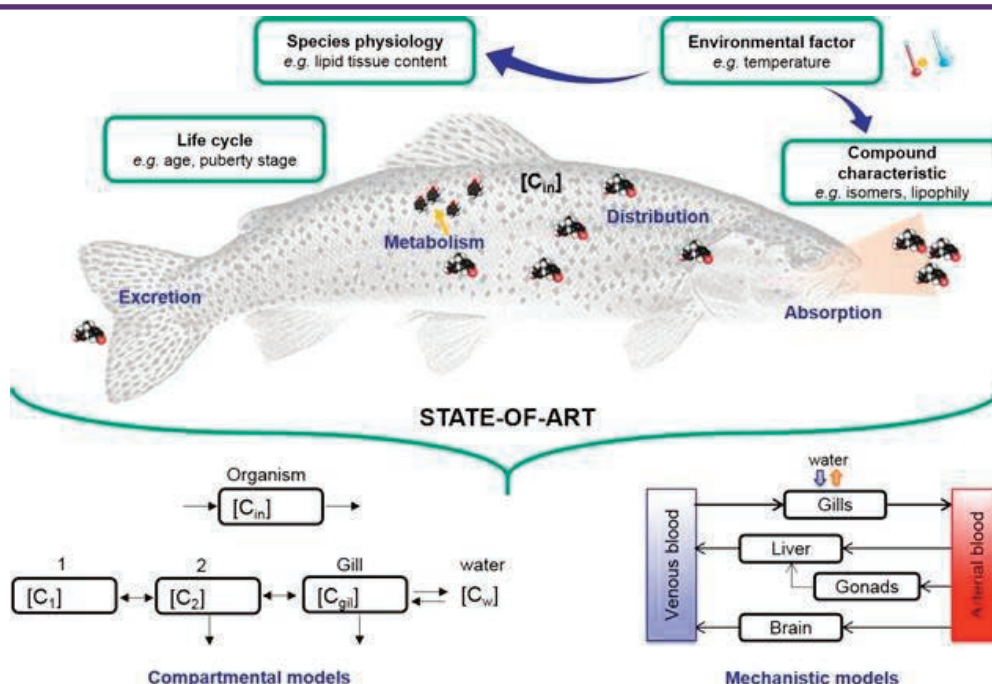
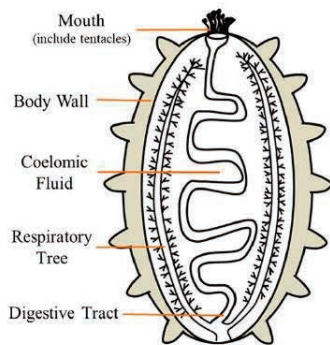


Figura 1.- Aplicación de diferentes tipos de modelos toxicocinéticos para la evaluación de riesgos medioambientales producidos por sustancias químicas (41). Reproducido con permiso.

(a) Anatomy of sea cucumber



(b) Schematic representation of MCT model on sea cucumber

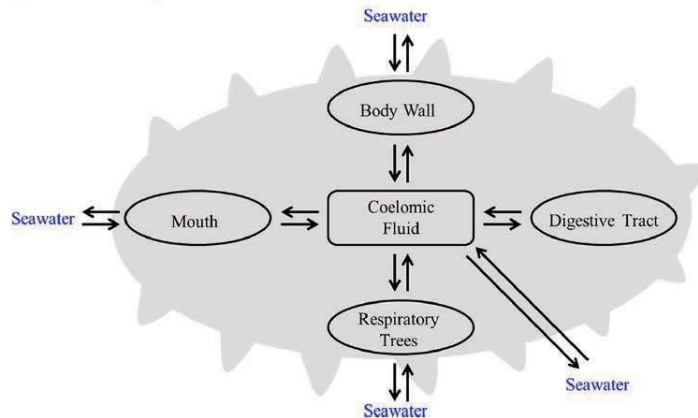


Figura 2.- Modelo toxicocinético multicompartmental para caracterizar la disposición de antibióticos en diferentes estructuras anatómicas del pepino de mar (40). Repro-ducido con permiso.

modelo permite predecir la acumulación y el metabolismo de antibióticos como sulfadiazina, trimetoprim, enrofloxacin, ofloxacin, claritromicina y azitromicina en las diferentes estructuras anatómicas por exposición a dichos antibióticos en el agua de mar a diferentes concentraciones (40).

### 5.5. Modelos poblacionales

Los modelos poblacionales han adquirido un enorme auge en los últimos años, especialmente en el campo de la farmacocinética clínica (42). Los modelos farmacocinéticos de población desarrollados por Lewis B Sheiner y Stuart L Beal en la década de los años 80 del siglo pasado, abordan el estudio de la variabilidad inter e intraindividual en la farmacocinética cuando el fármaco se administra en un grupo de población con características definidas (43,44). Un modelo de población está constituido por un modelo estructural y un modelo de varianza. El modelo estructural está a su vez constituido por un modelo farmacocinético habitualmente compartimental como los modelos mono y bicompartimental y un modelo de regresión. El modelo de regresión correlaciona parámetros fundamentales del modelo como el aclaramiento de eliminación el volumen aparente de distribución con covariables demográficas y clínicas que inciden en la farmacocinética. Adicionalmente los modelos poblacionales optimizan un modelo de varianza que cuantifica la magnitud de la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos y la variabilidad residual de las concentraciones plasmáticas (42).

En los últimos años se han desarrollado modelos poblacionales en el campo de la toxicocinética de diferentes elementos tóxicos como metilmercurio (MeHg) en animales y en el hombre, habiéndose evaluado, por ejemplo, la relación entre la ingesta y las concentraciones así como la semi-vida de metilmercurio en el hombre utilizando un modelo toxicocinético poblacional (45,46).

Los modelos poblacionales en el campo de la toxicocinética pueden extenderse también a nivel toxicodinámico apareciendo los modelos toxicocinéticos/toxicodinámicos (TX/TD por sus siglas en inglés). Diversos autores han planteado utilizar modelos toxicocinéticos-toxicodinámicos (TX/TD) para la evaluación de riesgos ambientales en el campo de la ecotoxicología (47,48).

Como ejemplo, se han propuesto diferentes modelos TX/TD experimentales para evaluar los efectos letales en el crustáceo *Daphnia magna* expuesto a la acción de pesticidas agrícolas como trifluralina (TFT). Este modelo se basa en la utilización de un modelo cinético monocompartimental asociado a un modelo probabilístico de supervivencia (49). Asimismo y utilizando un modelo poblacional cruzado colaborativo en ratones, se ha podido demostrar la compleja relación entre el perclorometileno (PERC) y su metabolito primario triclorometano (TCA) en diferentes tejidos a nivel toxicocinético y toxicodinámico (50,51).

También se han desarrollado modelos de este tipo para simular la toxicidad crónica del cobre en el mejillón cebra, expresada en base al estrés oxidativo y basado en el reparto del cobre en fracciones subcelulares. Este modelo permite evaluar la absorción, metabolismo, desintoxicación y eliminación así como los niveles de metal en los lugares de acción relacionados con la respuesta tóxica (52).

Se ha propuesto la utilización de modelos TK/TD espacio-temporales para la evaluación de riesgos medioambientales de productos químicos en organismos del suelo como las lombrices de tierra. Este tipo de modelos espacio-temporales considera simultáneamente la evaluación de la exposición y el efecto. El modelo de exposición utiliza información espacio-temporal sobre variables ambientales como temperatura, humedad, contenido en materia orgánica y concentración de determinados productos químicos.



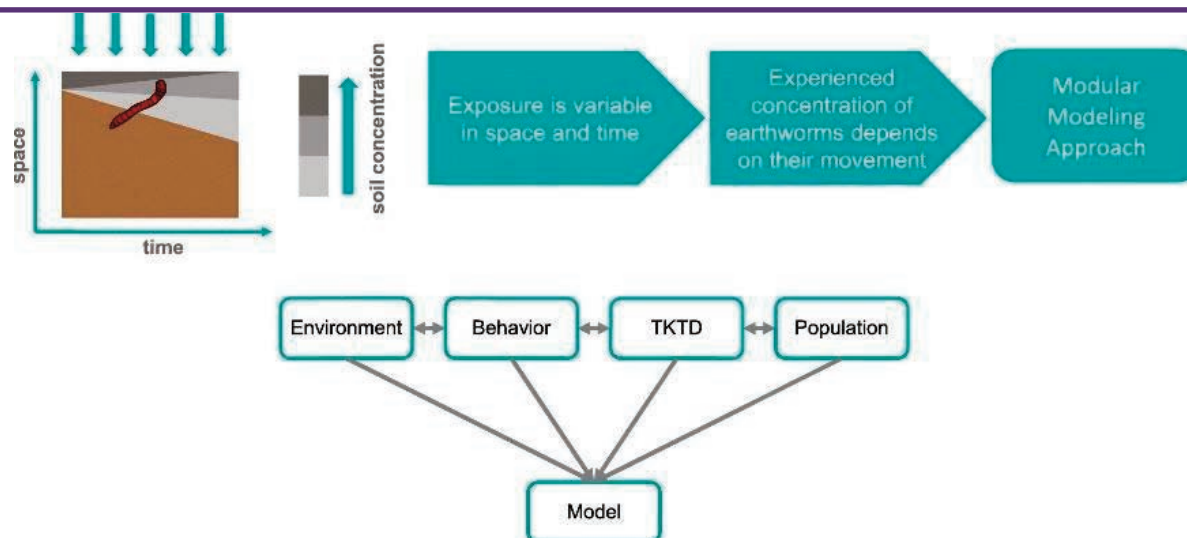


Figura 3.- Modelos TK/TD espacio-temporales para simular la exposición a variables ambientales y su efecto en organismos del suelo (53). Reproducido con permiso.

El modelo de comportamiento utiliza la información del modelo de exposición para simular la alimentación y el movimiento de diferentes especies de lombrices. El modelo TK/TD está acoplado a un modelo de población que incorpora modelos de comportamiento poblacional de diferentes especies de lombrices de tierra como se observa en la Figura 3 (53).

### 5.6. Modelos toxicocinéticos con base fisiológica (PBTK)

Los modelos farmacocinéticos con base fisiológica conocidos como modelos PBPK se introducen en el campo de la farmacocinética hacia finales de la década de los años 60 del siglo pasado y actualmente constituyen una herramienta habitual en el análisis farmacocinético de muchos fármacos, tanto en especies animales como en el hombre (54,55). A diferencia de los modelos compartimentales basados en ecuaciones polioxponenciales y constantes de velocidad de primer orden u ordenes alternativos, los modelos PBPK consideran al organismo dividido en compartimentos anatómicos como sistema circulatorio, órganos y tejidos. Estos modelos utilizan ecuaciones diferenciales ordinarias para el balance masa del fármaco en organismo, y parámetros con base fisiológica como el flujo sanguíneo, la permeabilidad de las membranas biológicas, el peso o tamaño de los tejidos o isothermas de fijación a estructuras celulares e intracelulares (56).

El concepto de modelos PBPK asociado habitualmente a la disposición de fármacos se sustituye por el acrónimo PBTK (por sus siglas en inglés) cuando se utilizan modelos con base fisiológica para evaluar el comportamiento toxicocinético de diferentes sustancias. En la década de los años 90 ya se propuso la utilización de un modelo poblacional toxicocinético PBTK para evaluar la distribución y eliminación de Benzeno y sus metabolitos en el hombre y este tipo de modelos comienzan a utilizarse en el campo de la toxicocinética coincidiendo con el cambio de siglo (57-62).

En los últimos años se ha observado un importante auge en la utilización de modelos PBTK para evaluar datos toxicocinéticos de diferentes sustancias (63-82). Como ejemplo, este tipo de modelos se han utilizado para caracterizar la toxicocinética y su variabilidad de sustancias como percloroetileno en ratón o para la disposición de contaminantes orgánicos como benzopireno y sus metabolitos en el esturión blanco (63,83). Diversos autores han utilizado modelos con base fisiológica, en los que se han incluido datos de respuesta toxicodinámica incluidos en modelos mixtos integrados, denominados modelos PBTK-TD (por sus siglas en inglés) (60,74,77).

Como ejemplo, se ha utilizado un modelo PBTK-PD para evaluar la bioacumulación de arsénico en peces de la especie *Tilapia* así como sus implicaciones para la salud humana a través del consumo alimentario de esta especie por el hombre (60). también se ha recurrido a este tipo de modelos para evaluar la toxicocinética y toxicodinámica de cadmio y plomo en pez cebra. el modelo consta de un submodelo PBTK que permite predecir la captación y disposición de los metales y un modelo toxicodinámico que predice la acumulación del metal en el cuerpo del animal hasta que se supera un umbral de concentración que incrementa la probabilidad de mortalidad (74).

Recientemente se han utilizado este tipo de modelos para evaluar la disposición de 4-nonylphenol (4-np) en el hombre y los cambios asociados a la edad evaluando la toxicidad en células epiteliales. El modelo permite predecir los cambios toxicocinéticos y toxicodinámicos de 4-np asociados con la edad, con importantes implicaciones en la evaluación de riesgos en el hombre por exposición a sustancias tóxicas ambientales (77).

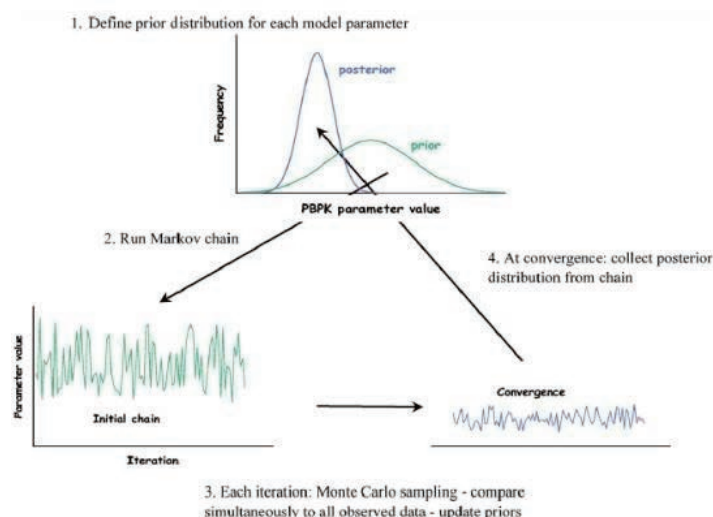


Figura 4. Método iterativo basado en Cadenas de Markov y simulación de Montecarlo (MCMC) para la estimación de parámetros mediante estadística bayesiana a partir de un modelo toxicocinético PBPK (85). Reproducido con permiso.

### 5.7. Métodos bayesianos en toxicocinética

La necesidad de individualizar el comportamiento toxicocinético en humanos o en diferentes especies animales, disponiendo de información experimental limitada, hace que progresivamente se hayan introducido los métodos bayesianos en el campo de la toxicocinética. El método bayesiano permite individualizar los parámetros que definen el perfil toxicocinético de una sustancia, utilizando conjuntamente datos de concentración plasmática de la sustancia, con parámetros de población correspondientes a modelos poblacionales toxicocinéticos. Los antecedentes de la estadística bayesiana, con importantes implicaciones en la dosificación individualizada de fármacos, hay que buscarlos en el campo de la farmacocinética clínica y actualmente este tipo de metodología juega un papel fundamental en la dosificación de precisión basada en modelos (MIPD por sus siglas en inglés). desde hace dos décadas la estadística bayesiana comienza a utilizarse en el campo de la toxicocinética (42,84,85).

En estadística bayesiana, el comportamiento poblacional de la sustancia tóxica en humanos o en diferentes especies animales constituye la probabilidad previa de la hipótesis que se combina con información adicional sobre los niveles séricos de la sustancia tóxica en humanos o en la especie animal estudiada. Una estimación de la probabilidad máxima a posteriori (MAP por sus siglas en inglés) mediante métodos de regresión no lineal, o incluso recurriendo a métodos de inteligencia artificial como las redes neuronales artificiales, permite establecer de forma individualizada los parámetros toxicocinéticos en el hombre o en la especie animal estudiada (86).

Alternativamente el método bayesiano puede recurrir a la utilización de métodos iterativos basados en las cadenas de markov asociada a simulación de montecarlo (MCMC por sus siglas en inglés) como se observa en la figura 4. Este método ha sido uti-

lizado para la evaluación de riesgos producidos por la exposición a xenobióticos como diclorometano (DCM) (85).

Más recientemente, diferentes estudios han recurrido a la estadística bayesiana con aplicaciones diversas. Modelos poblacionales toxicocinéticos (TXTK) de exposición a cadmio se han utilizado mediante una estrategia bayesiana MCMC para la evaluación de riesgos en diferentes entornos de exposición al cadmio mediante la estimación de parámetros toxicocinéticos de este xenobiótico en la población china (87). También se ha utilizado la estrategia bayesiana MCMC para el modelado PBPK del impacto de la enfermedad del hígado graso no alcohólico en la toxicocinética del percloroetileno en ratones (63). Una metodología similar se ha utilizado para el ajuste de datos de concentración de contaminantes orgánicos y sus metabolitos como benzopireno, pireno, azoxiestrobina o cloruro de 4-nitrobencilo en invertebrados acuáticos, utilizando un modelo compartimental toxicocinético de biotransformación. (88).

Alternativamente se ha recurrido al método bayesiano en estudios *in vitro* de toxicocinética de alto rendimiento (HTTK por sus siglas en inglés) para la estimación *in vitro* de parámetros como la fracción libre o el aclaramiento intrínseco con implicaciones en estudios de correlación *in vitro in vivo* para la predicción *in silico* del comportamiento toxicocinético (89).

## 6. FUTURO DE LA TOXICOCINÉTICA

Como ocurre en numerosos campos científicos el futuro de los estudios de toxicidad de fármacos y en particular de toxicocinética va a estar ligado a la inteligencia artificial mediante modelos basados en metodologías de *deep learning*, como las redes neuronales artificiales. Trabajos recientes han demostrado





la utilidad de este tipo de metodología en toxicología predictiva. Actualmente se están utilizando técnicas de alto rendimiento que generan un elevado volumen de datos o *big data* sobre toxicidad de productos químicos que unidos a técnicas de inteligencia artificial basados en metodologías de *deep learning* permite generar modelos cuantitativos de relación estructura/actividad (QSAR) o de estructura/farmacocinética (QSPKR) para la predicción de la toxicidad, incluyendo asimismo el comportamiento toxicocinético (90,91).

## 5. CONCLUSIONES

La toxicocinética constituye una disciplina emergente, cuyos fundamentos y bases científicas se asientan en la farmacocinética y que tiene una fuerte proyección en la evaluación de la disposición y la respuesta por exposición a ciertos xenobióticos, tanto en el hombre como en especies animales sometidas a riesgos medioambientales.

Afortunadamente la colaboración interdisciplinar en el campo de la toxicocinética y en otras muchas disciplinas es, en la actualidad, una realidad y cada vez son más escasas las "islas de investigación". En el campo de la salud este tipo de investigación es muy acusada y tanto en los hospitales como en los centros de atención primaria y en otras instituciones son habituales los equipos interprofesionales. Hoy los médicos, farmacéuticos, veterinarios y otros profesionales, abordan conjuntamente problemas relacionados con la mejora de la calidad de la terapéutica farmacológica y el cuidado de la salud.

## 6. REFERENCIAS

- Domínguez-Gil A, Cadórniga R, González MC. Estudio biofarmacéutico de la asociación coloidal N-butil bromuro de escopolamina y lauril sulfato sódico I. II Farmaco 1974; 29(4): 165-83.
- Sesión necrológica en homenaje al Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. Anal Real Acad Farm 2000; 66: 449-69.
- Cadórniga R. La obtención de un nuevo medicamento: azar y perseverancia en la investigación farmacéutica. Discurso Inaugural del curso académico 1986-87. Universidad Complutense. Madrid.
- Carlucci A, Bregni C. Rafael Cadórniga: vigencia de uno de los pioneros de la biofarmacia y farmacocinética. Acta Farm Bonaerense 2003; 22(1): 87-90.
- Sesión necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. Ana Real Acad Med 1999, Tomo CXVI: 685-708.
- Balali-Mood M, Naseri K, Tahergerabi Z. Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium and arsenic. Frontiers Pharmacology 2021; 4(7):1-13.
- Ribas Ozonas B. Tóxicos metálicos y búsqueda de nuevos marcadores. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia. 05-04-1990.
- Pourret O, Hursthouse A. It's time to replace the term "Heavy Metals" with "Potentially Toxic Elements" when reporting environmental research. Inten J Envir Public Health 2019; 16: 1446-54.
- Maté C, Ribas B, Acobetto RI, Santos Ruiz A. Lithium and rubidium effects on the motor activity of rats. An Real Acad Farm 1979; 45: 279-86.
- Molina G, Ribas B, Delso JL, Galarza AM, García del Amo C, Santos Ruiz A. Datos preliminares sobre absorción y eliminación de zinc-65 en conejos. Rev Esp Fisiol 1961; 17(2): 81-8.
- Ribas B, Pire I, García del Amo C, Santos Ruiz A. Influencia de la gestación sobre la distribución de cinc-65 en conejos inyectados por vía intramuscular y en su descendencia. Rev Esp Fisiol 1963; 19(2): 83-94.
- Ribas B, Pire I, García Amo C, Santos Ruiz A. Acumulación de cinc-65 en feto y en estructuras placentarias de conejo en función de la edad de gestación. Rev Esp Fisiol 1963; 19(2): 95-103.
- Ribas B, Bando I, Martínez Trueba MM, Santamaria J, Morcillo M. Metallothionein as a marker in mercury nephrotoxicity. En: Bach PH et al. Nephrotoxicity. Chapter 82: 531-5. Marcel Dekker, New York 1991.
- Novelli ELB, Vieira EP, Rodrigues NL, Ribas B. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. Environ Res Section A 1998; 79: 102-5.
- Arranz MA, Pérez Escolano MI, Saiz Vadillo MC, Basagoiti I, Katarneh SM, Ribas B, Cadórniga R. Farmacocinética del cadmio-109 en sangre y estructuras cerebrales de rata. Rev Esp Fisiol 1984; 40: 365-0.
- Ribas B, Cadórniga R, Sainz Vadillo MC, Lobato N, de la Torre A, Bondia S. Pharmacokinetics of 63-nickel in the rat. Editor: Anke M, Schneider HJ, Bruckner C. Editorial: AWP Karl Marx Universität Leipzig. RDA. NICKEL 1980; 3: 93-100.
- Ribas B, Acobetto RI, Sainz Vadillo MC, Arranz MA, Cadórniga R. Kinetics of 86- rubidium in blood and cerebral structures of the rat. En: Mineral Elements 80. Kolvistoinen M. The Academy of Finland, Helsinki 1981; II: 465-74.
- Ribas B, Lobato Rodrigues N, Sánchez Reus MI, Saiz Vadillo MC, García Martín MC, de la Torre AM, Bondia S, Tamarit Torres J, Caórniga R. Algunos datos sobre la significación bioquímica del níquel. Rev Esp Fisiol 1982; 38 (supl): 321-6.
- Ribas B, Acobetto RI, Maté C, Santos Ruiz A. Some effects of rubidium chloride on the motor activity and brain serotonin concentrations of rats. Biochem Soc Trans 1979; 7: 533-4.
- García Amo C, Ribas Ozonas B. Interreacciones en el metabolismo del zinc. Acciones de los iones calcio y cadmio sobre los niveles de cinc-65 en conejo. An Real Acad Farm 1967; (2): 197-208.



21. Ribas B, Dean M, Santos Ruiz A. Inhibitory effect of cadmium on alkaline phosphatase of kidney and prostate of guinea-pig. *Trace Element Metabolism in Animals*. Vol. I. Editorial CF Mills. E.S. Livingstone, Edinburgh-London. 1970; pp.1973-6.
22. Blackburn E. Telomere effect. Ed. Orion Paperbacks, 2018.
23. Braeuning A, Marx-Stoelting P. Mixture prioritization and testing: the importance of toxicokinetics. *Arch Toxicol*. 2021; 95(5):1863-1864.
24. Gergs A, Gabsi F, Zenker A, Preuss TG. Demographic Toxicokinetic-Toxicodynamic Modeling of Lethal Effects. *Environ Sci Technol*. 2016; 50(11):6017-24.
25. Zhong WZ, Williams MG, Branstetter DG. Toxicokinetics in drug development: an overview of toxicokinetic application in the development of PNU-101017, an anxiolytic drug candidate. *Curr Drug Metab*. 2000; 1(3):243-54.
26. Schwartz S. Providing toxicokinetic support for reproductive toxicology studies in pharmaceutical development. *Arch Toxicol*. 2001; 75(7):381-7.
27. Sun T, Kang Y, Liu J, Zhang Y, Ou L, Liu X, Lai R, Shao L. Nanomaterials and hepatic disease: toxicokinetics, disease types, intrinsic mechanisms, liver susceptibility, and influencing factors. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19(1):108.
28. Llop S, Ballester F, Broberg K. Effect of Gene-Mercury Interactions on Mercury Toxicokinetics and Neurotoxicity. *Curr Environ Health Rep*. 2015; 2(2):179-94.
29. Jadán-Piedra C, Crespo Á, Monedero V, Vélez D, Devesa V, Zúñiga M. Effect of lactic acid bacteria on mercury toxicokinetics. *Food Chem Toxicol*. 2019; 128:147-153.
30. Veiga-Matos J, Remião F, Motaes A. Pharmacokinetics and Toxicokinetics Roles of Membrane Transporters at Kidney Level. *J Pharm Pharm Sci*. 2020; 23:333-356.
31. Tolonen A, Pelkonen O. Analytical challenges for conducting rapid metabolism characterization for QIVIVE. *Toxicology*. 2015; 332:20-9.
32. Fu Y, Li W, Flarakos J. Critical considerations of matrix selection in LC-MS bioanalysis for toxicokinetic and pharmacokinetic assessment in drug development. *Bioanalysis*. 2021; 13(8):605-608.
33. Renkecz T, Scopchanova S, Hirka G, Szakonyiné IP. Development and Validation of an LC-MS-MS Method for the Quantification of Cyanate in Rat Plasma and Its Application to Toxicokinetic Bioanalysis. *J Anal Toxicol*. 2021; 45(9):1028-1035.
34. Yuzuriha T, Aizawa K, Okada J. Points to be considered for conducting toxicokinetic studies under GLP and for validating analytical methods. *J Toxicol Sci*. 1996; 21(5):505-9.
35. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017; 13(11):1147-1158.
36. Fagerholm U, Hellberg S, Alvarsson J, Spjuth O. In silico predictions of the human pharmacokinetics/toxicokinetics of 65 chemicals from various classes using conformal prediction methodology. *Xenobiotica*. 2022;52(2):113-118.
37. Roncaglioni A, Toropov AA, Toropova AP, Benfenati E. In silico methods to predict drug toxicity. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13(5):802-6.
38. Guéniche N, Bruyere A, Le Vée M, Fardel O. Implication of human drug transporters to toxicokinetics and toxicity of pesticides. *Pest Manag Sci*. 2020; 76(1):18-25.
39. Ye L, Liu J, Wang Y, Sun L, Fang Z, Deng Q, Qiu M, Zhao J. Development of a three-compartment toxicokinetic model for T-2 toxin in shrimp by blindfold particle swarm optimization algorithm. *Eco-toxicol Environ Saf*. 2021; 208:111698.
40. Zhu M, Wang Z, Chen J, Xie H, Zhao H, Yuan X. Bioaccumulation, Biotransformation, and Multicompartmental Toxicokinetic Model of Antibiotics in Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Environ Sci Technol*. 2020; 54(20):13175-13185.
41. Grech A, Brochet C, Dorne JL, Quignot N, Bois FY, Beaudouin R. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. *Sci Total Environ*. 2017; 578:1-15.
42. Martínez Lanao J. Conceptos en farmacocinética clínica. En *Manual de Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica*. Herrera Carranza J (Ed). Elsevier. Madrid. 2003; pp. 143-174.
43. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1980; 8(6):553-71.
44. Beal SL, Sheiner LB. Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng*. 1982; 8(3):195-222.
45. Pellicanò F, D'Orsi L, De Gaetano A, Panunzi S. A population approach for the estimation of methylmercury Toxicokinetics in red mullets. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021;428:115679.
46. Jo S, Woo HD, Kwon HJ, Oh SY, Park JD, Hong YS, Pyo H, Park KS, Ha M, Kim H, Sohn SJ, Kim YM, Lim JA, Lee SA, Eom SY, Kim BG, Lee KM, Lee JH, Hwang MS, Kim J. Estimation of the Biological Half-Life of Methylmercury Using a Population Toxicokinetic Model. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12(8):9054-67.
47. Jager T, Ashauer R. How to Evaluate the Quality of Toxicokinetic-Toxicodynamic Models in the Context of Environmental Risk Assessment. *Integr Environ Assess Manag*. 2018;14(5):604-614.
48. Santos FCF, van Gestel CAM, Amorim MJB. Toxicokinetics of copper and cadmium in the soil model *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta). *Chemosphere*. 2021; 270:129433.
49. Gergs A, Gabsi F, Zenker A, Preuss TG. Demographic Toxicokinetic-Toxicodynamic Modeling of Lethal Effects. *Environ Sci Technol*. 2016; 50(11):6017-24.
50. Cichocki JA, Furuya S, Venkatratnam A, McDonald TJ, Knap AH, Wade T, Sweet S, Chiu WA, Threadgill DW, Rusyn I. Characterization



- of Variability in Toxicokinetics and Toxicodynamics of Tetrachloroethylene Using the Collaborative Cross Mouse Population. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(5):057006.
51. Luo YS, Cichocki JA, Hsieh NH, Lewis L, Wright FA, Threadgill DW, Chiu WA, Rusyn I. Using Collaborative Cross Mouse Population to Fill Data Gaps in Risk Assessment: A Case Study of Population-Based Analysis of Toxicokinetics and Kidney Toxicodynamics of Tetrachloroethylene. *Environ Health Perspect.* 2019; 127(6):67011.
52. Le TTY, Grabner D, Nachev M, García MR, Balsa-Canto E, Peijnenburg WJGM, Hendriks AJ, Sures B. Development of a toxicokinetic-toxicodynamic model simulating chronic copper toxicity to the Zebra mussel based on subcellular fractionation. *Aquat Toxicol.* 2021; 241:106015.
53. Roeben V, Oberdoerster S, Rakel KJ, Liesy D, Capowicz Y, Ernst G, Preuss TG, Gergs A, Oberdoerster C. Towards a spatiotemporally explicit toxicokinetic-toxicodynamic model for earthworm toxicity. *Sci Total Environ.* 2020 ; 722:137673.
54. Bischoff KB, Dedrick RL. Thiopental pharmacokinetics. *J Pharm Sci.* 1968; 57(8):1346-51.
55. Chen CN, Andrade JD. Pharmacokinetic model for simultaneous determination of drug levels in organs and tissues. *J Pharm Sci.* 1976; 65(5):717-24.
56. Bois FY, Brochet C. Modeling Pharmacokinetics. *Methods Mol Biol.* 2016; 1425:37-62.
57. Bois FY, Jackson ET, Pekari K, Smith MT. Population toxicokinetics of benzene. *Environ Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 6(Suppl 6):1405-11.
58. Sweeney LM, Himmelstein MW, Gargas ML. Development of a preliminary physiologically based toxicokinetic (PBTK) model for 1,3-butadiene risk assessment. *Chem Biol Interact.* 2001; 135-136:303-22.
59. Bogdanffy MS, Sarangapani R. Physiologically-based kinetic modeling of vapours toxic to the respiratory tract. *Toxicol Lett.* 2003; 138(1-2):103-17.
60. Ling MP, Liao CM, Tsai JW, Chen BC. A PBTK/TD modeling-based approach can assess arsenic bioaccumulation in farmed tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and human health risks. *Integr Environ Assess Manag.* 2005;1(1):40-54.
61. Kim D, Andersen ME, Chao YC, Egeghy PP, Rappaport SM, Nylander-French LA. PBTK modeling demonstrates contribution of dermal and inhalation exposure components to end-exhaled breath concentrations of naphthalene. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(6):894-901.
62. Jongeneelen FJ, Berge WF. A generic, cross-chemical predictive PBTK model with multiple entry routes running as application in MS Excel; design of the model and comparison of predictions with experimental results. *Ann Occup Hyg.* 2011;55(8):841-64.
63. Dalajamts C, Cichocki JA, Luo YS, Rusyn I, Chiu WA. Quantitative Characterization of Population-Wide Tissue- and Metabolite-Specific Variability in Perchloroethylene Toxicokinetics in Male Mice. *Toxicol Sci.* 2021; 182(2):168-182.
64. Tan YM, Chan M, Chukwudebe A, Domoradzki J, Fisher J, Hack CE, Hinderliter P, Hirasawa K, Leonard J, Lumen A, Paini A, Qian H, Ruiz P, Wambaugh J, Zhang F, Embry M. PBPK model reporting template for chemical risk assessment applications. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020; 115:104691.
65. Breen M, Ring CL, Kreutz A, Goldsmith MR, Wambaugh JF. High-throughput PBTK models for in vitro to in vivo extrapolation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021; 17(8):903-921.
66. Schneckener S, Preuss TG, Kuepfer L, Witt J. A workflow to build PBTK models for novel species. *Arch Toxicol.* 2020; 94(11):3847-3860.
67. Tebby C, van der Voet H, de Sousa G, Rorije E, Kumar V, de Boer W, Kruisselbrink JW, Bois FY, Faniband M, Moretto A, Brochet C. A generic PBTK model implemented in the MCRA platform: Predictive performance and uses in risk assessment of chemicals. *Food Chem Toxicol.* 2020;142:111440.
68. Cooper AB, Aggarwal M, Bartels MJ, Morris A, Terry C, Lord GA, Gant TW. PBTK model for assessment of operator exposure to haloxypop using human biomonitoring and toxicokinetic data. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019; 102:1-12.
69. Bessems JG, Loizou G, Krishnan K, Clewell HJ 3rd, Bernasconi C, Bois F, Coecke S, Collnot EM, Diembeck W, Farcal LR, Geraets L, Gundert-Remy U, Kramer N, Küsters G, Leite SB, Pelkonen OR, Schröder K, Testai E, Wilk-Zasadna I, Zaldivar-Comenges JM. PBTK modelling platforms and parameter estimation tools to enable animal-free risk assessment: recommendations from a joint EPA-EURL ECVAM ADME workshop. *Regul Toxicol Pharmacol.* 201; 68(1):119-39.
70. Olie JD, Bessems JG, Clewell HJ 3rd, Meulenbelt J, Hunault CC. Evaluation of semi-generic PBTK modeling for emergency risk assessment after acute inhalation exposure to volatile hazardous chemicals. *Chemosphere.* 2015; 132:47-55.
71. Ding J, Liu W, Zhang H, Zhu L, Zhu L, Feng J. Liver-Based Probabilistic Risk Assessment of Exposure to Organophosphate Esters via Dust Ingestion Using a Physiologically Based Toxicokinetic (PBTK) Model. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(23):12469.
72. Zhang S, Wang Z, Chen J. Physiologically based toxicokinetics (PBTK) models for pharmaceuticals and personal care products in wild common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere.* 2019; 220:793-801.
73. Mit C, Bado-Nilles A, Daniele G, Giroud B, Vulliet E, Beaudouin R. The toxicokinetics of bisphenol A and its metabolites in fish elucidated by a PBTK model. *Aquat Toxicol.* 2022; 247:106174.
74. Zhang Y, Feng J, Gao Y, Liu X, Qu L, Zhu L. Physiologically based



- toxicokinetic and toxicodynamic (PBTK-TD) modelling of Cd and Pb exposure in adult zebrafish *Danio rerio*: Accumulation and toxicity. *Environ Pollut.* 2019; 249:959-968.
75. Liu YH, Yao L, Huang Z, Zhang YY, Chen CE, Zhao JL, Ying GG. Enhanced prediction of internal concentrations of phenolic endocrine disrupting chemicals and their metabolites in fish by a physiologically based toxicokinetic incorporating metabolism (PBTK-MT) model. *Environ Pollut.* 2022; 314:120290.
76. Fabian E, Gomes C, Birk B, Williford T, Hernandez TR, Haase C, Zbranek R, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. In vitro-to-in vivo extrapolation (IVIVE) by PBTK modeling for animal-free risk assessment approaches of potential endocrine-disrupting compounds. *Arch Toxicol.* 2019; 93(2):401-416.
77. Jeong SH, Jang JH, Lee YB. Development of physiologically-based toxicokinetic-toxicodynamic (PBTK-TD) model for 4-nonylphenol (4-NP) reflecting physiological changes according to age in males: Application as a new risk assessment tool with a focus on toxicodynamics. *Environ Pollut.* 2022; 312:120041.
78. Kenyon EM. Arsenic toxicokinetic modeling and risk analysis: Progress, needs and applications. *Toxicology.* 2021;457:152809.
79. Schupp T. Read across for the derivation of Indoor Air Guidance Values supported by PBTK modelling. *EXCLI J.* 2018; 17:1069-1078.
80. Zhu YS, Yang JQ, Wang N, Deng ZQ, Qing Y, Wu M, Cai H, Liu H, He GS. Estimation of the bio-accessibility of methylmercury from aquatic foods using a PBTK model with an approximate Bayesian computation method in Chinese pregnant women. *Food Chem Toxicol.* 2022; 168:113372.
81. Gingrich J, Filipovic D, Conolly R, Bhattacharya S, Veiga-Lopez A. Pregnancy-specific physiologically-based toxicokinetic models for bisphenol A and bisphenol S. *Environ Int.* 2021; 147:106301.
82. Sarigiannis DA, Karakitsios S, Dominguez-Romero E, Papadaki K, Brochet C, Kumar V, Schuhmacher M, Sy M, Mielke H, Greiner M, Mengelers M, Scheringer M. Physiology-based toxicokinetic modelling in the frame of the European Human Biomonitoring Initiative. *Environ Res.* 2019; 172:216-230.
83. Grimard C, Mangold-Döring A, Alharbi H, Weber L, Hogan N, Jones PD, Giesy JP, Hecker M, Brinkmann M. Toxicokinetic Models for Bio-concentration of Organic Contaminants in Two Life Stages of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Environ Sci Technol.* 2021; 55(17):11590-11600.
84. Maier C, Hartung N, Kloft C, Huisinga W, de Wiljes J. Reinforcement learning and Bayesian data assimilation for model-informed precision dosing in oncology. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2021; 10(3):241-254.
85. Jonsson F, Johanson G. The Bayesian population approach to physiological toxicokinetic-toxicodynamic models--an example using the MCSim software. *Toxicol Lett.* 2003;138(1-2):143-50.
86. Hughes JH, Keizer RJ. A hybrid machine learning/pharmacokinetic approach outperforms maximum a posteriori Bayesian estimation by selectively flattening model priors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2021; 10(10):1150-1160.
87. Qing Y, Yang J, Zhang Q, Zhu Y, Ruiz P, Wu M, Zhao G, Zhao Q, Liu H, Cai H, Qin L, Zheng W, He G. Bayesian toxicokinetic modeling of cadmium exposure in Chinese population. *J Hazard Mater.* 2021; 413:125465.
88. Ratier A, Lopes C, Geffard O, Babut M. The added value of Bayesian inference for estimating biotransformation rates of organic contaminants in aquatic invertebrates. *Aquat Toxicol.* 2021;234:105811.
89. Wambaugh JF, Wetmore BA, Ring CL, Nicolas CI, Pearce RG, Honda GS, Dinallo R, Angus D, Gilbert J, Sierra T, Badrinarayanan A, Snodgrass B, Brockman A, Strock C, Setzer RW, Thomas RS. Assessing Toxicokinetic Uncertainty and Variability in Risk Prioritization. *Toxicol Sci.* 2019; 172(2):235-251.
90. Zhang J, Norinder U, Svensson F. Deep Learning-Based Conformal Prediction of Toxicity. *J Chem Inf Model.* 2021; 61(6):2648-2657.
91. Tang W, Chen J, Wang Z, Xie H, Hong H. Deep learning for predicting toxicity of chemicals: a mini review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2018; 36(4):252-271.

Si desea citar nuestro artículo:

**Iniciación a la toxicocinética desde la Real Academia Nacional de Farmacia: un ejemplo de colaboración académica**

Bartolomé Ribas Ozonas, Alfonso Domínguez-Gil Hurl y José Martínez Lanao

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 455-468

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.13>



# REGULACIÓN DEL TRACTO URINARIO INFERIOR: MICCIÓN E INCONTINENCIA URINARIA

## REGULATION OF THE LOWER URINARY TRACT: URINATION AND URINARY INCONTINENCE

**Albino García Sacristán**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Catedrático emérito de Fisiología en la Universidad Complutense de Madrid

**corresponding author:** agarcias@ucm.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

La incontinencia urinaria representa un grave problema social, médico y económico, que sufre un aumento progresivo, debido al incremento en la expectativa de vida que los avances sociales, sanitarios y culturales han conseguido. Se calcula que en el mundo presentan aproximadamente incontinencia urinaria unos doscientos millones de personas con una gran repercusión económica de gran trascendencia que puede desbordar las previsiones de cobertura de los diferentes sistemas de servicios de asistencia sanitaria. Nuestro grupo del Departamento de Fisiología de la UCM lleva varios años estudiando la fisiología del tracto urinario inferior (TUI) con el objeto de determinar los neurotransmisores y receptores que regulan estas estructuras. Este mayor conocimiento de la Fisiología y Fisiopatología del TUI ha permitido que estas disfunciones puedan ser corregidas con métodos farmacológicos frente a la alternativa tradicional de la cirugía.

#### ABSTRACT

*Urinary incontinence represents a serious social, medical and economic problem, which suffers a progressive increase, due to the increase in life expectancy that social, health and cultural advances have achieved. It is estimated that in the world there are approximately two hundred million people in urinary incontinence with a great economic impact of great importance that can exceed the coverage forecasts of the different systems of health care services. Our group from the Department of Physiology of the UCM has been studying the physiology of the lower urinary tract (LUT) for several years in order to determine the neurotransmitters and receptors that regulate these structures. This greater knowledge of the Physiology and Pathophysiology of the LUT has allowed these dysfunctions to be corrected with pharmacological methods compared to the traditional alternative of surgery.*

#### Palabras Clave:

micción  
incontinencia  
neurotransmisión química  
neurotransmisores  
receptores

#### Keywords:

micturition  
urinary incontinence  
chemical neurotransmission  
neurotransmitters  
receptors



## 1. INTRODUCCIÓN

La continencia urinaria es una función básica que se adquiere en la infancia y que se debe mantener hasta las edades más avanzadas, en ausencia de procesos patológicos. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Continencia, la incontinencia urinaria se define como *la pérdida involuntaria de orina que condiciona un problema higiénico y/o social, y que se puede demostrar objetivamente* (1).

La incontinencia urinaria representa un grave problema social, médico y económico, que sufre un aumento progresivo, debido al incremento en la expectativa de vida que los avances sociales, sanitarios y culturales han conseguido. Socialmente, la incontinencia urinaria, es una causa de malestar, dependencia y sentimiento de aislamiento social. Incluso, en ocasiones, contribuye a la hospitalización de estas personas y su alejamiento del medio ambiente familiar. Además, se debe tener en cuenta los daños psicológicos y la pérdida de autoestima que sufre el enfermo incontinente.

Es importante destacar que entre un 10-15% de los sujetos mayores de 65 años que viven en sus domicilios padecen incontinencia urinaria, entre los ancianos hospitalizados el porcentaje asciende a un 30-40% y se alcanza la máxima prevalencia (50-60%) entre los ingresados en centros residenciales. Se calcula que en el mundo presentan aproximadamente incontinencia urinaria unos doscientos millones de personas. En EE.UU. se gastan anualmente más de 16.000 millones de dólares en los costes directos e indirectos causados por estos pacientes. Se ha estimado incluso que la incontinencia urinaria tiene una prevalencia tan importante como algunas enfermedades crónicas entre las que se encuentran el asma, la isquemia coronaria y la úlcera gástrica (2). En España 4 millones de personas padecen síntomas de urgencia miccional, aumento de la frecuencia miccional e incontinencia urinaria, esto conlleva una gran repercusión económica de gran trascendencia que puede desbordar las previsiones de cobertura de los diferentes sistemas de servicios de asistencia sanitaria. Por ejemplo, el gasto en absorbentes de incontinencia urinaria en nuestro país representa un coste anual de 154 millones de euros (3).

Aunque la edad avanzada por sí sola no conlleva a los escapes de orina, en el envejecimiento normal o fisiológico se van presentando una serie de cambios que la favorecen. Entre estos cambios se incluyen (4):

- Disminución de la elasticidad vesical, lo que disminuye la capacidad de la vejiga y requiere un vaciamiento más frecuente.
- Disminución en la fuerza de contracción del músculo detrusor, lo que conduce a un vaciamiento incompleto de la vejiga y a un incremento del volumen residual.

- Incremento en las contracciones espontáneas del músculo detrusor.
- Disminución en la capacidad de posponer la micción.
- Disminución en la presión de cierre uretral.
- Disminución de la fuerza de los músculos pélvicos de soporte.

La mayor prevalencia de incontinencia urinaria en las mujeres postmenopáusicas se debe fundamentalmente a la deficiencia de estrógenos que causa atrofia del epitelio uretral y que conduce a una reducción en la eficiencia de los esfínteres uretrales. La pérdida de tono de los músculos del suelo de la pelvis, que se producen no solo por la edad sino también por los embarazos múltiples, los partos traumáticos o una intervención pelviginológica puede contribuir a la incontinencia urinaria en la mujer.

En el varón la hiperplasia benigna de próstata ocasiona la obstrucción del cuello de la vejiga y de la uretra prostática que motiva cambios a nivel vesical de variada trascendencia clínica. El incremento progresivo de la resistencia al vaciamiento vesical por el crecimiento de la hiperplasia prostática, motiva una respuesta funcional y anatómica del detrusor para compensar la obstrucción, aumentando la fuerza y el número de las contracciones vesicales. Mediante este mecanismo se supera la resistencia y se consigue vaciar correctamente la vejiga, sin orina residual. Si la hiperplasia prostática se prolonga en el tiempo se genera una hiperplasia vesical cuyos mecanismos compensadores son insuficientes, lo que determina un vaciamiento incompleto de la vejiga urinaria que motiva la presencia de orina residual. La distensión vesical genera cambios isquémicos en la pared muscular y alteraciones hidrodinámicas que afectan al tracto urinario superior, con uropatía obstructiva que puede conducir finalmente a la insuficiencia renal crónica.

## 2. FISIOLÓGIA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR (TUI)

En los últimos años se han producido cambios considerables en la farmacoterapia de las disfunciones miccionales, que han permitido que muchas de estas patologías, sobre todo aquellas que aparecen en neuropatologías encubiertas, no evidentes, con el trasfondo funcional, no orgánico, puedan ser corregidas con métodos farmacológicos frente a la alternativa tradicional de la cirugía. De este modo, las derivaciones urinarias supravescicales, las cistostomías permanentes, la cirugía correctora de supuestas alteraciones cérvico uretrales orgánicas y numerosas esfinterotomías han sido sustituidas por otras estrategias terapéuticas en las que se incluye la farmacológica. Junto a ello, han aparecido nuevos fármacos que han conseguido resultados terapéuticos eficaces (5).

Todo ello es consecuencia de un mayor conocimiento de la Fisiología y Fisiopatología del tracto urinario inferior. Nuestro



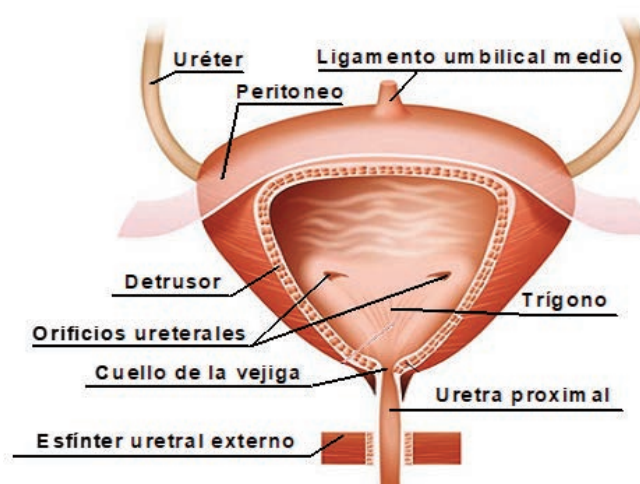


Figura 1. Estructura de la vejiga urinaria y la uretra (6).

grupo del Departamento de Fisiología de la UCM primero en la Facultad de Veterinaria y desde el año 2001 en la Facultad de Farmacia lleva varios años estudiando la fisiología del tracto urinario inferior con el objeto de determinar los neurotransmisores y receptores que regulan estas estructuras.

La principal función de la vejiga urinaria es transformar la continua función excretora de los riñones en un proceso intermitente de evacuación. Para ello, el funcionamiento del tracto urinario inferior requiere un complejo sistema neural de regulación que coordina la actividad vegetativa y somática de sus diferentes componentes.

La vejiga se divide en dos partes: el cuerpo y la base. El cuerpo vesical es la porción superior y más amplia de la vejiga, que aumenta considerablemente de volumen cuando está llena de orina. La capa muscular de la vejiga corresponde al músculo detrusor, cuya contracción es esencial para garantizar el vaciado completo de la vejiga. La base comprende el cuarto inferior de la vejiga, se encuentra localizada caudalmente al cuerpo y en ella desembocan los uréteres. La base se estrecha constituyendo el cuello vesical y se continúa inmediatamente con la uretra proximal. El conjunto de los dos orificios uretrales superiores y otro orificio inferior y caudal presenta una forma de triángulo invertido, motivo por lo que esta zona recibe el nombre de trigono vesical (6). (Figura 1).

La uretra es el último segmento de las vías urinarias responsable de la conducción de la orina al exterior. Su anatomía difiere en relación al sexo, ya que en el masculino, además de su función urinaria, es responsable del transporte del semen a nivel de su porción anterior, esponjosa o peneana. La uretra masculina se extiende desde el cuello vesical hasta la extremidad libre del pene o meato uretral, en la que se distinguen tres regiones: prostática, membranosa y esponjosa o peneana. La uretra prostática atraviesa el espesor de la próstata de la que recibe su secreción por los con-

ductos eyaculatorios. A continuación se dispone la porción membranosa de la uretra, la cual, atraviesa el periné donde se rodea de un anillo de fibras musculares estriadas constituyendo el denominado esfínter uretral externo o rabdoesfínter de control voluntario. La última, y porción más larga de la uretra es la esponjosa o peneana que finaliza en el glándulo en un orificio denominado meato urinario. La uretra femenina, que únicamente conduce la orina al exterior, es más corta que la masculina, y desemboca en la extremidad anterior de la vulva, inmediatamente por detrás del clítoris. La uretra está formada por una capa interna o mucosa, una media (solo en los machos) o conectiva laxa (en las hembras) y una externa o muscular lisa con fibras longitudinales y transversales, cuyo cierre es producido como consecuencia de la contracción involuntaria y voluntaria, esta última variable según las especies, de los esfínteres uretrales interno y externo, respectivamente (6).

El almacenamiento y la eliminación periódica de orina producida en los riñones es regulada por el sistema nervioso que coordina la actividad recíproca de dos unidades funcionales en el tracto urinario inferior: un reservorio (la vejiga urinaria) y una región de salida (el cuello vesical y la uretra proximal, así como la musculatura estriada del denominado esfínter uretral externo o rabdoesfínter). La regulación de la vejiga urinaria y la uretra es dependiente de dos grupos de nervios periféricos: simpáticos y parasimpáticos con sus correspondientes vías aferentes y eferentes. Estas dos funciones de llenado y vaciado vesical son el resultado de una compleja interrelación en la que participan, de forma sinérgica, la unión ureterovesical, la pared del cuerpo de la vejiga, el cuello vesical y la uretra. La uretra presenta una inervación somática, a través del nervio pudendo, responsable de la contracción voluntaria del músculo estriado del esfínter uretral externo y una inervación vegetativa responsable de la contractilidad involuntaria de la musculatura lisa del esfínter uretral interno (7). (Figura 2).

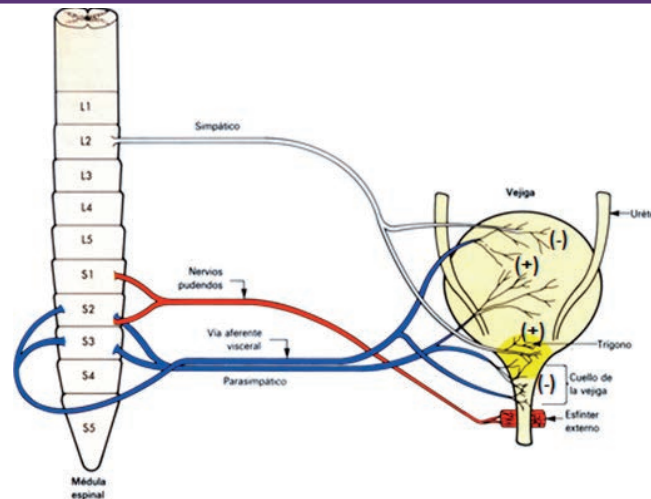


Figura 2. Inervación del Tracto Urinario Inferior (TUI) (6).

### 3. REGULACIÓN DEL TRACTO URINARIO INFERIOR (TUI)

La médula espinal recibe influencias de niveles superiores del sistema nervioso central (tronco del encéfalo, tálamo y corteza cerebral). La regulación ejercida por el sistema nervioso autónomo es modulada por centros medulares y encefálicos de forma antagónica. Así la activación del sistema nervioso simpático favorece el llenado de la vejiga mientras que el sistema nervioso parasimpático regula su vaciado (8). (Figura 3).

Los centros motores simpáticos estimulan la contracción del músculo liso del cuello de la vejiga y la uretra proximal y la relajación del músculo detrusor en el cuerpo de la vejiga. Las neuronas preganglionares simpáticas se localizan en la columna intermedio-lateral de los segmentos medulares toracolumbares T11-L2. Dichas fibras preganglionares liberan acetilcolina (ACh) que se une a receptores nicotínicos de las neuronas postganglionares, las cuales, discurren por el nervio hipogástrico liberando noradrenalina (NA) en sus terminaciones (9,10,11). Este neurotransmisor produce una

potente relajación del detrusor vía activación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  y  $\beta_3$  y la contracción del cuello vesical y la uretra proximal a través de la unión de la NA a receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y de la endotelina-1 a receptores ET<sub>A</sub> (12,13,14,15).

La inervación somática es responsable de la contracción voluntaria del músculo estriado del esfínter uretral externo. Dichas fibras se originan en las astas ventrales de los segmentos medulares sacros S2-S4, salen por las raíces ventrales y constituyen el nervio pudendo. La estimulación de dicho nervio produce la contracción del músculo estriado uretral externo, como consecuencia de la liberación de ACh y su unión con receptores nicotínicos musculares. Los nervios hipogástrico, pélvico y pudendo llevan, además, señales sensoriales a través de aferentes que van desde la vejiga y la uretra a la médula espinal lumbosacra. Las aferentes del nervio pélvico, monitorizan el volumen de la vejiga en la fase de llenado. Dicha inervación sensorial está integrada por aferentes tipo III (A $\delta$ ) débilmente mielinizadas presentes en la capa muscular y por aferentes tipo IV (C) amielínicos de localización más dispersa en el mús-

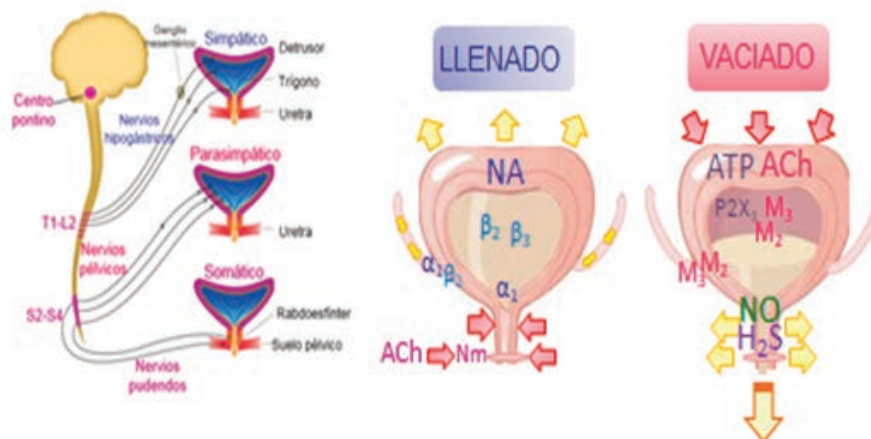


Figura 3. Regulación nerviosa del llenado y vaciado de la vejiga urinaria (6).

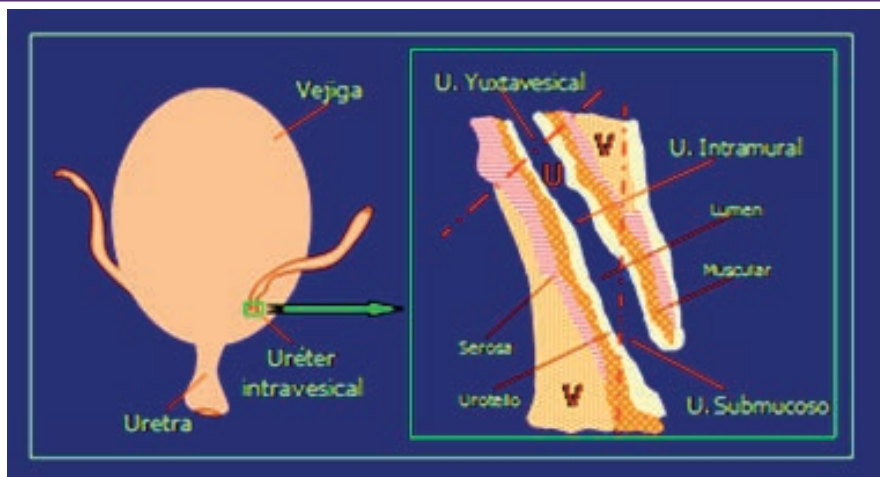


Figura 4. Estructura del uréter intravesical (6).

culo y en el interior del urotelio. Las fibras C que pueden ser sensibles o insensibles a la neurotoxina sensorial, capsaicina, presentan un umbral más alto de generación de impulsos en respuesta al estiramiento de la pared vesical que las fibras A $\delta$ . Estas últimas, además, responden principalmente a la distensión vesical mientras que las fibras C también pueden ser activadas por varios neurotransmisores, como la adenosina 5'-trifosfato (ATP) y las taquicinas, liberados desde el urotelio y del músculo detrusor (16).

La micción es el proceso de evacuación de la orina de la vejiga a través de la uretra, cuando se ha alcanzado un dintel de llenado vesical. Esta actividad es producida por un acto reflejo que, a través de una vía espino-bulbo-espinal, coordina la actividad del denominado centro pontino de la micción o núcleo de Barrington y de la sustancia gris periacueductal del tronco del encéfalo.

La capacidad de adaptación de la vejiga al llenado de orina tiene un límite, a partir del cual la sensación de repleción vesical, que era imperceptible, se hace molesta y posteriormente dolorosa. Cuando se alcanza un dintel de llenado de la vejiga urinaria, surge la sensación de llenado vesical y el deseo miccional, sensación que irá aumentando progresivamente. Las fibras parasimpáticas del nervio pélvico constituyen la principal inervación excitadora del detrusor y tienen su origen en los segmentos medulares sacros S2-S4 (Núcleo de Onuf) (17). En el nervio pélvico discurren tanto fibras sensitivas como motoras. Las fibras nerviosas sensitivas detectan el grado de distensión de la pared de la vejiga, siendo dicha señal mecánica, responsable del inicio de los reflejos que provocan el vaciado de la vejiga. La activación del sistema nervioso parasimpático, a través de la columna intermediolateral de la médula sacra, libera ACh a nivel de los ganglios del plexo pélvico (efecto nicotínico) donde estimulan las fibras postganglionares que, a su vez, liberan ACh en la unión ureterovesical y en el músculo detrusor e inducen su contracción vía activación de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> (11). La secreción de ACh, desde las terminaciones nerviosas parasimpá-

ticas, se produce conjuntamente con ATP, la cual, actúa como co-transmisor parasimpático responsable del inicio de la contracción de la pared vesical por activación de los receptores purinérgicos P2X<sub>1-3</sub>. Asimismo, los nervios parasimpáticos ejercen un efecto relajante en el músculo liso del cuello de la vejiga y de la uretra proximal a través de la liberación de óxido nítrico (NO) y de sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>) (18,19,20).

El NO, cuya liberación es modulada por receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y canales de K<sup>+</sup> sensibles al voltaje (Kv) de localización presináptica, produce relajación del cuello de la vejiga y la uretra a través de un mecanismo dependiente de la activación de la guanilato ciclasa soluble (21). Se ha identificado, además, un componente inhibidor independiente de NO que representa más del 50% de la relajación de la base de la vejiga vía activación de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa. Entre los neurotransmisores inhibidores cabe destacar el ATP, la 5-HT y péptidos, como el VIP, el PACAP 38 y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), los cuales, desempeñan un papel crucial en la relajación del cuello vesical (22,23,24). Así, el ATP produce la relajación del músculo liso del cuello de la vejiga a través de receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>, mientras que la 5-HT, cuyo efecto es modulado por receptores serotoninérgicos presinápticos 5-HT<sub>1A</sub>, induce la relajación vía receptores musculares 5-HT<sub>7</sub> acoplados a la vía de la proteína cinasa A (PKA) sin involucrar activación de los canales de K<sup>+</sup> de membrana. Finalmente el VIP y el PACAP 38 promueven relajación del cuello de la vejiga a través de los receptores VPAC<sub>2</sub>, mientras que el CGRP y la ET-1 producen relajación de la base de la vejiga vía activación de receptores CGRP<sub>2</sub> y ET<sub>B</sub>, respectivamente, acoplados a la vía de la PKA (15,25). Otros péptidos como la BK provocan un efecto dual, relajante y/o contráctil, a través de la activación de receptores de BK B<sub>2</sub> presentes en las terminaciones nerviosas y en el músculo liso, respectivamente (26). Asimismo, inhibidores de la fosfodiesterasa 4 y hormonas esteroideas gona-

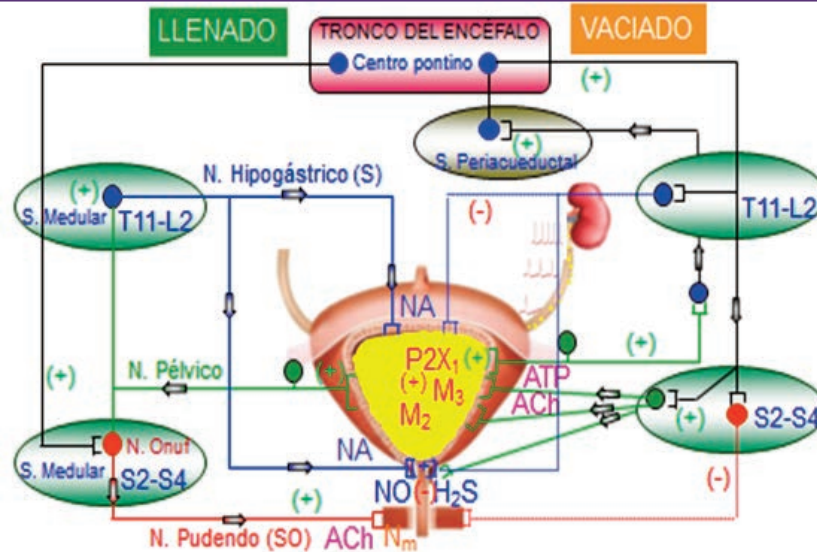


Figura 5. Regulación nerviosa de la función vesical y uretral (6).

dales promueven una potente relajación de la base de la vejiga (27). Recientemente, se ha identificado, un papel clave del  $H_2S$  como molécula gaseosa señalizadora en la neurotransmisión del cuello vesical, produciendo la relajación de la musculatura lisa a través de la activación de canales  $K_{ATP}$  y de la liberación de neuropéptidos sensoriales inhibidores como el PACAP 38 y el CGRP (28,29). Estos mediadores, en conjunto, provocan la relajación involuntaria del esfínter interno. Este hecho junto con la relajación voluntaria del esfínter estriado uretral externo promueve el vaciado completo de la vejiga urinaria.

Estudios urodinámicos realizados en la unión uréterovesical, unidad funcional constituida por un componente uretral (uréter intravesical) y otro vesical (detrusor circundante) (Figura 4), muestran dos tipos de ondas denominadas rápidas y lentas. Las ondas rápidas representan la actividad peristáltica ureteral, la cual favorece el transporte del bolo de orina a través del uréter y su vaciado en la vejiga urinaria, mientras que las ondas lentas, debidas a la influencia del detrusor, impiden el reflujo vesicoureteral una vez evacuado el bolo de orina a la vejiga (30). Estudios *in vitro* han demostrado un control adrenérgico (31) y colinérgico (32) en la actividad de esta unidad funcional. La innervación adrenérgica desempeña un papel fisiológico en la coordinación del uréter intravesical durante la fase de llenado de la vejiga urinaria. La noradrenalina estimula ambos componentes contráctiles (actividad fásica y tono) de la musculatura lisa ureteral. Dicha respuesta es mediada a través de receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  adrenérgicos. La relajación de la pared ureteral se produce a través de la estimulación de receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgicos (33). Diversos estudios han demostrado la existencia de una población heterogénea de receptores muscarínicos en el uréter intravesical. Así un 83% de dicha población pertenece al subtipo  $M_2$  mientras que el 17% restante está formado por una mezcla de

receptores  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_4$  (34). Estos receptores muscarínicos cuando son estimulados por la acetilcolina provocan la contracción de la musculatura lisa ureteral (35). La existencia de esta rica innervación en el uréter intravesical permite a esta estructura regular el paso del bolo de orina desde el uréter a la vejiga urinaria y el cierre del mismo una vez producida la descarga de la orina a la vejiga, como sucede durante la fase de llenado vesical bajo regulación simpática. Por el contrario, durante la fase de vaciado de orina se produce una potente contracción del musculo detrusor de la vejiga urinaria por acción del sistema nervioso parasimpático. En esta situación la acetilcolina no solo contrae el músculo detrusor sino también el detrusor circundante y el uréter intravesical, es decir la unión uréterovesical, evitando el reflujo vésicoureteral de orina durante la micción de crucial importancia desde el punto de vista patológico.

Diversos estudios han demostrado que el NO, la adenosina, el NPY, el VIP, el CGRP, la 5HT, el  $H_2S$  y las taquicinas están involucrados en la neurotransmisión de la unión uréterovesical (36,37,38,39,40). El NO y el CGRP participan en la neurotransmisión inhibitoria ureteral relajando el músculo liso a través de un mecanismo dependiente del GMPc y del AMPc, respectivamente, mediante la activación de canales de  $K^+$  sensibles a la glibenclámda. La adenosina modula la neurotransmisión excitadora ureteral y relaja la musculatura lisa a través de receptores purinérgicos  $P_1$  postsinápticos del subtipo  $A_{2B}$  por un mecanismo independiente del NO o de prostaglandinas (41). El NPY potencia la actividad fásica y el tono ureteral inducidos por la noradrenalina, activando receptores  $Y_2$  (42). También, se ha puesto de manifiesto que las taquicinas, péptidos que coexisten en terminaciones primarias sensibles a la capsaicina, están implicadas en la neurotransmisión excitadora no adrenérgica no colinérgica, provocando la contracción del uréter intravesical a través de receptores  $NK_2$  (43).



## 4. CONCLUSIÓN

Por todo lo comentado, el almacenamiento y eliminación periódica de orina por el tracto urinario inferior constituye un acto fisiológico automatizado regulado por medio de una rica inervación autónoma y somática que permite generar un complejo mecanismo de coordinación entre la unión uréterovesical, la vejiga urinaria y la uretra (Figura 5).

## 5. REFERENCIAS

1. Abrams P, Blaivas JG, Stanto SL, Andersen JT. The standardization of terminology of lower urinary tract function. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1988; 114:5-19.
2. Payne CK. Pathophysiology and evaluation of urinary incontinence and overactive bladder. *Urology* 1998; 51:3-10.
3. Juarranz Sanz M, Terrón Barbosa R, Roca Guardiola M, Soriano Llorca T M, Villamor Borrego M, Calvo Alcántara MJ. Tratamiento de la incontinencia urinaria. *Atención Primaria* 2002; 30:323-332.
4. Mold JW. Pharmacotherapy of urinary incontinence. *Am Fam Physician* 1996; 54:673-680.
5. Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacological Reviews* 2004; 56: 581-631.
6. Hernández Rodríguez MV. Fisiología de las vías urinarias. En: *Fisiología Veterinaria*. Editor: Albino García Sacristán. Editorial Tébar Flores. Madrid, 2018, pp. 565-575. (ISBN: 978-84-7360-571-7).
7. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 2004; 84: 935-986.
8. De Groat WC, Downie JW, Lewin RM, Longlin AT, Morrison JFB. Basic neurophysiology and neuropharmacology. En: *Incontinence, 1st International Consultation on Incontinence*. Eds. Abrams P, Khoury S, Wein A., Plymouth, UK, Health Publications Ltd, 1999: pp 105-154.
9. García Sacristán A, Casanueva, CR, Castilla C, Labadía A. Adrenergic receptors in the urethra and prostate of the horse. *Res Vet Sci* 1984; 36: 57-60.
10. Labadía A, Rivera L, Costa G, García Sacristán A. Influence of the autonomic nervous system in the horse urinary bladder. *Res Vet Sci* 1988; 44: 282-285.
11. Prieto D, Benedito S, Rivera L, Hernández M, García Sacristán A. Autonomic innervation of the equine urinary bladder. *Anat Histol Embryol* 1990; 19: 276-287.
12. Rivera L, Benedito S, Prieto D, Hernández M, Labadía A, García Sacristán A.  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenoceptors in the sheep urinary bladder. *Res Vet Sci* 1991; 50: 259-263.
13. García Pascual A, Costa G, García Sacristán A, Andersson KE. Calcium dependence of contractile activation of isolated sheep urethra I: Response to electrical stimulation. *Pharmacology Toxicology* 1991; 69: 263-269.
14. García Pascual A, Costa G, García Sacristán A, Andersson KE. Calcium dependence of contractile activation of isolated sheep urethra II: Response to exogenous noradrenaline. *Pharmacology Toxicology* 1991; 69: 270-275.
15. Arteaga JL, Orensanz LM, Martínez MP, Barahona MA, Martínez-Saenz A, Fernandes VS, Bustamante S, Carballido J, Benedito S, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Endothelin ETB receptors are involved in the relaxation to the pig urinary bladder neck. *NeuroUrol Urodyn* 2012, 31: 688-694.
16. Andersson KE. Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 2002; 59:43-50.
17. Rivera L, Prieto D, Hernández M, Benedito S, García Sacristán A. Distribution and function of cholinergic receptors in the sheep detrusor muscle. *J Auton Nerv Syst* 1991; 34: 95-102.
18. García Pascual A, Costa G, Isla M, Jiménez E, García Sacristán A. Potassium-induced contraction in the lamb proximal urethra : involvement of norepinephrine and different calcium entry pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 127-134.
19. García Pascual A, Costa G, García Sacristán A, Andersson KE. Relaxation of sheep urethral smooth muscle induced by electrical stimulation of nerves: involvement of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 1991; 141: 531-539.
20. Blaha I, López-Oliva ME, Martínez P, Recio P, Agis-Torres A, Martínez A, Benedito S, García Sacristán A, Prieto D, Fernandes VS, Hernández M. Bladder dysfunction in obese Zucker rat: Role of TRPA1 channels, oxidative stress and hydrogen sulfide. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 5641645.
21. Hernández M, Barahona MV, Recio P, Navarro-Dorado J, Bustamante S, Benedito S, García Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM Role of neuronal voltage-gated K<sup>+</sup> channels in the modulation of the nitrergic neurotransmission of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1251-1258.
22. Recio P, Barahona MV, Orensanz LM, Bustamante S, Martínez AC, Benedito S, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. 5-hydroxytryptamine induced relaxation in the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 271-280.
23. Hernández M, Barahona MV, Recio P, Benedito S, Martínez C, Rivera L, García Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM. Neuronal and smooth muscle receptors involved in the PACAP and VIP induced relaxations of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 100-109.
24. Martínez-Sanz A, Recio P, Orensanz LM, Fernandes VS, Martínez MP, Bustamante S, Carballido J, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Role of calcitonin gene-related peptide in inhibitory neurotrans-



- mission to the pig bladder neck. *J Urol* 2011; 186: 728-735.
25. Arteaga JL, Orensanz LM, Martínez MP, Barahona MV, Recio P, Martínez-Saenz A, Fernandes VS, Ribeiro ASF, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Mechanisms involved in endothelin-1-induced contraction of the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* 2012; 31: 156-161.
  26. Ribeiro ASF, Fernandes VS, Martínez MP, Martínez-Saenz A, Pazos MR, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Carballido J, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Neuronal and non-neuronal bradykinin receptors are involved in the contraction and/or relaxation to the pig bladder neck smooth muscle. *Neurourol Urodyn* 2014; 33: 558-565.
  27. Ribeiro ASF, Fernandes VS, Martínez-Saenz A, Martínez MP, Barahona MV, Orensanz LM, Blaha I, Serrano-Margüello D, Bustamante S, Carballido J, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Powerful relaxation of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram in the pig and human bladder neck. *J Sex Med* 2014; 11: 930-941.
  28. Fernandes VS, Ribeiro ASF, Martínez MP, Orensanz LM, Martínez-Saenz A, Barahona MV, Recio P, Bustamante S, Carballido J, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Endogenous hydrogen sulfide plays a powerful role in the inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *J Urol* 2013; 189: 1567-1573.
  29. Fernandes VS, Ribeiro ASF, Barahona MV, Orensanz LM, Martínez-Saenz A, Recio P, Martínez AC, Bustamante S, Carballido J, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck: role of KATP channels, sensory nerves and calcium signaling. *J Urol* 2013; 190: 746-756.
  30. Dixon JS, Jen PY, Yeung CK, Chow LT, Mathews R, Gearhart JP, Gosling JA. The structure and autonomic innervation of the vesico-uretic junction in cases of primary uretic reflux. *Br J Urol* 1998; 81: 146-151.
  31. Rivera L, Hernández M, Benedito S, Prieto D, García Sacristán A. Mediation of contraction and relaxation by alpha and beta-adrenoceptors in the ureterovesical junction of the sheep. *Res Vet Sci* 1992; 52: 57-61.
  32. Rivera L, Hernandez M, Benedito S, Prieto D, García Sacristán A. Mediation of contraction by cholinergic muscarinic receptors in the ureterovesical junction. *J Auton Pharmacol* 1992; 12: 175-181.
  33. Hernández M, Prieto D, Simonsen U, Rivera L, Barahona MV, García Sacristán A. Noradrenaline modulates smooth muscle activity of the isolated intravesical ureter of the pig through different types of adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 924-931.
  34. Hernández M, García Sacristán A, Orensanz LM. Muscarinic binding sites of the pig intravesical ureter. *J Auton Pharmacol* 1995; 15: 351-359.
  35. Hernández M, Simonsen U, Prieto D, Rivera L, García P, Ordaz E, García Sacristán A. Different muscarinic receptor subtypes mediating the phasic activity and basal tone of pig isolated intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1413-1420.
  36. Hernández M, Prieto D, Orensanz LM, Barahona MV, Jimenez-Cidre M, Rivera L, García Sacristán A, Simonsen U. Involvement of a glibenclamide-sensitive mechanisms in the nitergic neurotransmission of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 609-616.
  37. Hernández M, Barahona MV, Simonsen U, Recio P, Rivera L, Martínez AC, García Sacristán A, Orensanz LM, Prieto D. Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in the pig isolated intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 137-144.
  38. Hernández M, Barahona MV, Recio P, Rivera L, Benedito S, Martínez AC, García Sacristán A, Orensanz LM, Prieto D. Heterogeneity of neuronal and smooth muscle receptors involved in the VIP- and PACAP-induced relaxations of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 123-131.
  39. Fernandes VS, Ribeiro ASF, Martínez MP, Barahona MV, Orensanz LM, Martínez-Saenz A, Recio P, Benedito S, Bustamante S, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M.: Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to the pig intravesical ureter. *PLoS ONE* 2014, 9(11): e113580.
  40. Ribeiro ASF, Fernandes VS, Martínez MP, López Oliva ME, Barahona MV, Recio P, Martínez AC, Blaha I, Orensanz LM, Bustamante S, García Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Pre- and post-junctional bradykinin B2 receptors regulate smooth muscle tension to the pig intravesical ureter. *Neurourol Urodyn* 2016; 35: 115-121.
  41. Hernández M, Barahona MV, Bustamante MV, García Sacristán A, Orensanz L. A2B adenosine receptors mediate relaxation of the pig intravesical ureter adenosine modulation of non adrenergic non cholinergic excitatory neurotransmission. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 969-974.
  42. Prieto D, Hernández M, Rivera L, García Sacristán A, Simonsen U. Distribution and functional effects of neuropeptide Y on equine ureteral smooth muscle and resistance arteries. *Reg Pept* 1997; 69: 155-165.
  43. Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, Contreras L, García Sacristán A, Hernández M. Tachykinergic excitatory neurotransmission in the pig intravesical ureter. *J Urol* 2000; 164:

Si desea citar nuestro artículo:

**Regulación del tracto urinario inferior:  
micción e incontinencia urinaria**

Albino García Sacristán

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 469-476

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.14>



# PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS: ENZIMAS EN BUSCA DE FUNCIÓN BIOLÓGICA

## RIBOSOME INACTIVATING PROTEINS: ENZYMES IN SEARCH OF BIOLOGICAL FUNCTION

Tomás Girbés Juan<sup>1\*</sup>, y Damián Córdoba Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Instituto Universitario de Farmacia Industrial (IUFI). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 28040, Madrid.

corresponding author: \*tomas.girbes@uva.es

### ARTÍCULO

#### RESUMEN

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs del acrónimo “*ribosome-inactivating proteins*”) son enzimas (N-glicosidasas clasificadas como ARNr N-glicohidrolasas, EC 3.2.2.22), en su mayor parte de origen vegetal, aunque también de origen bacteriano, fúngico y de algas que provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por los ribosomas de organismos superiores y algunas bacterias. La actividad enzimática consiste en la depuración específica de los ribosomas que los incapacita para interactuar con el factor de elongación 2 en eucariontes y G en procariontes. Las RIPs más conocidas, ricina y abrina constituidas por dos cadenas polipeptídicas (tipo2), la cadena enzimática y una lectina específica de D-galactosa y galactósidos, son extremadamente tóxicas debido a que pueden internalizarse en las células al unirse a receptores de la membrana plasmática, entrar al citoplasma, alcanzar el aparato de Golgi y después llegar al retículo endoplásmico rugoso, en donde son transferidas al citosol y allí inactivar a los ribosomas. Las RIPs más abundantes solo poseen una cadena enzimática (tipo 1) y no poseen la toxicidad de ricina y abrina. En la actualidad se desconoce su función biológica en vegetales, aunque se han propuesto distintas hipótesis sobre su mediación en respuesta de estrés vegetal y frente a patógenos. Las RIPs han encontrado una aplicación muy interesante en la construcción de inmunotoxinas y conjugados en la terapia experimental del cáncer. La formulación de diversas RIPs en nanopartículas se ha empleado para optimizar sus propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas y también con fines diagnósticos.

#### ABSTRACT

*Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are enzymes (N-glycosidases classified as rRNA N-glycohydrolases, EC 3.2.2.22), mostly of plant origin, but also of bacterial, fungal and algal origin, which cause irreversible inhibition of protein biosynthesis carried out by ribosomes of superior organisms and some bacteria. The enzymatic activity consists of specific depurination of ribosomes that renders them unable to interact with elongation factor 2 in eukaryotes and elongation factor G in prokaryotes. The best-known RIPs, ricin and abrin, consisting of two polypeptide chains (type 2), an enzymatic chain and a lectin chain specific for D-galactose and galactosides, are extremely toxic because they can be internalised in cells by binding to plasma membrane receptors, entering the cytoplasm, reaching the Golgi apparatus, and then reaching the rough endoplasmic reticulum, where they are transferred to the cytosol and there inactivate ribosomes. The most abundant RIPs possess only one enzymatic chain (type 1) and do not possess the toxicity of ricin and abrin. Their biological function in plants is currently unknown, although different hypotheses have been proposed for their mediation in plant stress response and against pathogens. RIPs have found an interesting application in the construction of immunotoxins and conjugates in experimental cancer therapy. The formulation of RIPs into nanoparticles, has been used to optimize their biopharmaceutical and pharmacokinetic properties and for diagnostic purposes.*

#### Palabras Clave:

RIP  
enzima  
función  
inmunotoxina  
vectorizaciones

#### Keywords:

RIP  
enzyme  
funcio  
immunotoxi  
drug targeting



## 1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) constituyen un campo de investigación floreciente que se ha disparado exponencialmente en los últimos cuarenta años. El primer contacto del laboratorio de Valladolid con dichas proteínas se realizó en 1987, cuando después de estudiar una revisión de Antonio Jiménez y David Vázquez en el *Annual Review of Microbiology* de 1985 me pareció un buen tema de investigación para desarrollar en el incipiente laboratorio experimental que estaba organizando. En dicha revisión se abordaban ricina y abrina, dos poderosas toxinas inhibitoras de la biosíntesis de proteínas, así como otras proteínas que podría serlo también (1). Me animó el hecho de que durante mis estudios sobre la biosíntesis de proteínas en *Escherichia coli* en el laboratorio de David Vázquez, tuve la ocasión de conocer y tratar en 1974 al Prof. Sjur Olness, probablemente el mayor conocedor de la ricina en ese momento. En 1988, contacté con el Prof. Fiorenzo Stirpe del Departamento de Patología Experimental de la Universidad de Bolonia, que estaba en esos momentos en una fructífera investigación sobre proteínas inhibitoras de la biosíntesis de proteínas de una cadena y me invitó a su laboratorio un par de meses en 1988. Esto me inclinó a implicarme totalmente en el estudio de este tipo de proteínas, su distribución en vegetales, su estructura y función y sus aplicaciones.

En los últimos veinte años, han aparecido una serie de revisiones exhaustivas (2-11) que cubren la investigación central sobre las RIPs. A pesar de su distribución aparentemente amplia, especialmente en el reino vegetal, no hay datos de detección sistemáticos que respalden su ubicuidad. Las primeras RIPs identificadas fueron la ricina y la abrina, dos toxinas potentes estudiadas por Paul Ehrlich, pero solo en 1971 se encontró que la ricina inhibe la síntesis de proteínas eucariotas dañando los ribosomas (1, 12). Desde entonces se han identificado y aislado muchas otras proteínas con propiedades aparentemente idénticas, que desde un punto de vista estructural, se dividieron en dos grandes grupos: RIP tipo 1 y tipo 2 (2-5). El tipo 1, más numeroso, son proteínas de cadena única, fuertemente básicas, de 30 kDa, aproximadamente, que tienen actividad enzimática. Inhiben la síntesis de proteínas libres de células, pero son relativamente no tóxicas para las células y los animales. Las RIPs de tipo 2 son proteínas de 60-65 kDa, de un mínimo de dos cadenas polipeptídicas (AB) en las que una cadena enzimática A, similar a las RIPs de tipo 1, está unida a una cadena B ligeramente más grande con actividad de lectina específica para azúcares generalmente con la estructura de D-galactosa libre terminal (4); algunas como SNA I y las proteínas tetraméricas relacionadas (AB)<sub>2</sub> se unen a terminaciones de ácido siálico (5-6). La cadena B se une a las membranas

celulares, facilitando así la entrada de las RIPs AB o (AB)<sub>2</sub> completas en las células. Por lo tanto, este grupo incluye ricina, abrina y otras toxinas potentes encontradas posteriormente, pero también nigrina b de *Sambucus nigra* L. (13), ebulina I de *Sambucus ebulus* L. (14) y otras proteínas identificadas más recientemente, que tienen una estructura similar y propiedades enzimáticas, y son mucho menos tóxicas que la ricina. Por otro lado, algunos autores han postulado la creación de una nueva categoría, las RIPs tipo 3, para incluir algunas proteínas como la RIP b-32 o la JIP60. La primera de ellas se aísla del maíz como proenzima y se activa después de la eliminación de un segmento peptídico interno corto que libera dos segmentos de 16,5 y 8,5 kDa (15). Por su parte, la JIP60 es una RIP de cebada, en el que un segmento similar al RIP tipo 1 continúa con otro segmento de tamaño similar sin una función conocida (16). Parece injustificado definir un nuevo tipo de proteínas sobre la base de casos únicos y diferentes, y por el momento parece preferible considerar estas dos proteínas como RIPs peculiares de tipo 1.

Los dos tipos de RIP 1 y 2 podrían diferenciarse más adecuadamente sobre la base de la ausencia (tipo 1) o la presencia (tipo 2) de una cadena de lectinas, lo que marca una diferencia significativa en su modo de interactuar con las células. Esta clasificación permite encajar fácilmente otros ejemplos de RIP. Desde este punto de vista, las RIPs de cuatro cadenas como la SNA I (17) y la SNA I' (18) deben clasificarse como RIP de tipo 2. Además, algunas proteínas también pueden incluirse en la categoría RIP tipo 2, como SNRLP 1 y 2 (19) y la nigrina b básica (20), que exhiben la estructura clásica de dos cadenas AB, pero no pueden aglutinar los glóbulos rojos, debido muy probablemente a algún tipo de defecto en los dominios de unión de azúcar en la cadena B.

## 2. DISTRIBUCIÓN ENTRE PLANTAS, HONGOS, ALGAS Y BACTERIAS

El trabajo realizado en los últimos años reveló que las RIPs, están ampliamente distribuidos entre plantas, hongos, algas y bacterias (2-7, 11), y recientemente también se ha descrito una actividad de tipo RIP en tejidos de mamíferos (21). Las RIPs están presentes en una gama bastante amplia de familias aparentemente no relacionadas desde un punto de vista filogenético. La investigación sobre las RIPs hasta ahora se ha centrado en algunos pocos géneros y familias. Las familias más investigadas han sido: *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Phytolaccaceae*, *Poaceae*, *Sambucaceae*, *Viscaceae*, en algas *Laminariaceae* y en basidiomicetos, *Pleurotaceae* y *Tricholomataceae* (5, 6). En estas familias se han identificado diversas RIPs, en su mayoría isoformas, aunque muchas de ellas poseen actividades específicas distintas. Esto no indica una distribución limitada de estas proteínas,



ni un papel relativamente poco importante en las plantas. Esto podría ser simplemente una consecuencia del procedimiento de cribado que se llevó a cabo para encontrar plantas con altas concentraciones de actividad RIP precisamente en aquellas familias que anteriormente se había demostrado contener esta actividad en lugar de analizar de manera más amplia su distribución en todos los reinos, como se hace en la actualidad. Con este nuevo enfoque, se ha puesto de manifiesto que aproximadamente un tercio de todos los órdenes de plantas con flores contienen RIPs y que éstas, se pueden agrupar en quince categorías con diferentes características y propiedades, atendiendo a sus diversos dominios proteicos (2-6, 10, 11; estudios no publicados de Stirpe y Girbés). Nuestro laboratorio en la Universidad de Valladolid ha contribuido con el aislamiento de 24 RIPs de tipo 1 y 2 en 5 especies de *Sambucus*, así como otras 10 RIPs de tipo 1 en endemismos del norte de España del género *Petrocoptis*, en *Beta vulgaris*, en *Marah oreganus*, en *Trichosanthes kirilowii* y en *Muscari armeniacum* (2, 6). La baja actividad, si la hay, observada en muchos extractos de plantas puede deberse a una baja concentración de RIP en un extracto en particular o simplemente a la baja actividad del RIP presente. Probablemente, el uso de los fluidos supercríticos a baja temperatura como tecnología alternativa de extracción, permitiría aislar nuevas RIPs o RIPs funcionales en estos substratos. Incluso no puede excluirse que existan proteínas originalmente con actividad RIP que hayan perdido esta actividad y por lo tanto no pueden detectarse solo buscando la actividad enzimática. Esto podría haber restringido el enfoque del estudio a un número reducido de familias de plantas que se sabe desde hace muchos años que incluyen plantas que contienen RIP en varios de sus tejidos y, en algunos casos, en grandes cantidades, por ejemplo, *Saponaria officinalis* (22) y *Sambucus nigra* (13, 17-20), dos especies que contienen numerosas RIPs en hojas semillas y frutos, habiéndose aislado un gran número de estas proteínas de un solo tejido de la planta. Esto también podría haber reducido la visión de las RIPs como componentes potenciales de mecanismos aún desconocidos o no bien aclarados ampliamente representados en las plantas y tal vez en otros organismos como, por ejemplo, el papel antipatogénico en plantas desempeñado por las RIPs (23). El hecho de que algunas RIP puedan ser inducidas por diferentes factores como la senescencia (24), la infección por virus (25) y el estrés (26) apoya esta creencia. En nuestra opinión, probablemente las RIPs reproducen efectos pleiotrópicos que pueden estar orquestados por mecanismos aún desconocidos. Claramente, se necesita más investigación sobre ellas para determinar una imagen más apropiada sobre la distribución y la importancia de las RIPs en todos los reinos (7, 11).

Los pesos moleculares de las RIPs tipo 1 se encuentran normalmente en el rango de 21-38.000 Da, excepto una serie de

proteínas de bajo peso molecular que se alega que también son RIPs, con masas relativas aparentes en el rango de 8-13.500 Da. En lo que respecta a las RIPs de tipo 2, los pesos moleculares de estas proteínas se encuentran en el rango de masas relativas aparentes de 56-69.000 Da para las de tipo AB y de 120-240 kDa para las de tipo (AB)<sub>2</sub>. Se sabe desde hace muchos años que las RIPs también están presentes en bacterias. Así, las RIPs denominadas Stx1 y Stx2, se han aislado de *Escherichia coli* y actúan enzimáticamente como las RIPs de las plantas (27, 28). Por otro lado, las RIPs de tipo 1 se han encontrado también en los últimos años en hongos (29, 30) y en el alga *Laminaria japonica* A (31). Todos estos hallazgos favorecen la hipótesis generalmente aceptada de que las RIPs están ampliamente representadas y, por lo tanto, deben desempeñar funciones biológicas importantes, aunque en general aún poco definidas.

De los estudios realizados hasta ahora parece que las RIPs tipo 1 podrían ser más abundantes que las RIPs tipo 2. De hecho, hasta el descubrimiento de las RIPs tipo 2 en *Sambucus* (2), solo se habían descrito la ricina, la abrina, la viscumina, la módeccina y volkensina, las cinco altamente tóxicas para células animales y roedores (4, 5). En los primeros tiempos de la investigación sobre la distribución de las RIPs de tipo 2 se seguía el principio de que estas proteínas eran extremadamente tóxicas. Ello limitaba el cribado de las especies a las plantas venenosas o muy tóxicas, como *Ricinus communis*, *Abrus precatorius*, etc. Muy probablemente esto ha llevado a subestimar la presencia de estas proteínas en plantas no tóxicas, por lo que probablemente muchas de estas RIPs de tipo 2 han pasado desapercibidas, como tuvimos ocasión de demostrar con el descubrimiento del grupo especial de RIPs de tipo 2 no tóxicas respecto a la ricina en el género *Sambucus* constituido por nigrinas y ebulinas (16, 17). Las proteínas de estos subgrupos tienen la característica extraordinaria de que, aunque son aún más activos que la ricina a nivel molecular, es decir sobre la inactivación enzimática del ribosoma, carecen de la alta toxicidad de la ricina hacia las células animales cultivadas e *in vivo* en roedores. Por ejemplo, la concentración que provoca el 50% de inhibición de la síntesis de proteínas (IC<sub>50</sub>) en un sistema libre de células (lisado de reticulocitos de conejo) de nigrina b es de 0,03 nM, en células HeLa es de 27,6 nM y la dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>) en ratones es de 12 mg por kg de peso corporal (38). Estos valores significan que la nigrina b es tres veces más activa a nivel ribosómico que la ricina, pero es 25.000 veces menos tóxica en células animales cultivadas y 1.500 veces menos tóxica para ratones que la ricina (39).

El reconocimiento de que las plantas pueden tener RIP de tipo 2 no tóxicas en el género *Sambucus* (2, 13, 14) animó el estudio de este género en profundidad. Los estudios realizados indicaron que tanto nigrina b como ebulina I eran proteínas del tipo AB en

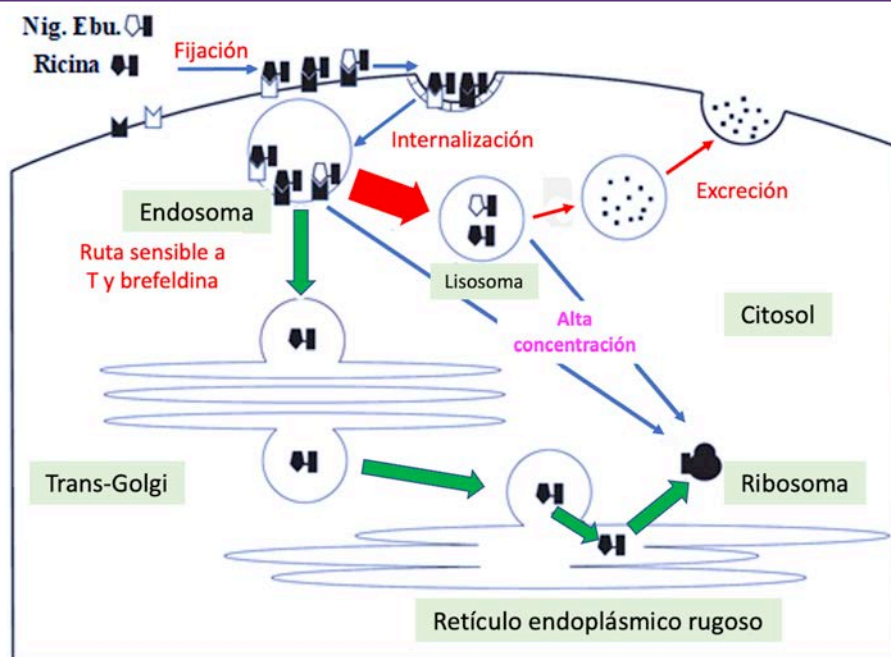


Figura 1. Esquema general de las rutas intracelulares seguidas por la ricina, nigrina y ebulina. Las flechas indican las rutas de tránsito.

donde A es una cadena polipeptídica con actividad enzimática, el mismo tipo de actividad que la ricina capaz de promover la depuración de la  $A_{4324}$  del ARNr 28S del ribosoma hepático de rata, lo que provoca la inactivación inmediata del ribosoma y por lo tanto la inhibición de la síntesis de proteínas (2, 13, 14). La cadena B es un polipéptido con actividad de lectina y afinidad por D-galactosa y galactósidos (2). Los experimentos de captación e internalización de la cadena A de ricina y la ebulina en cultivos celulares sugieren que la cadena A en general no tiene señales de translocación especiales para interactuar con la membrana plasmática, en cambio, las cadenas B si las tienen (32). Por lo tanto, la citotoxicidad reducida de la ebulina I en comparación con la ricina podría deberse a deficiencias de la cadena B (figura 1).

La clonación molecular, el estudio de la secuencia de aminoácidos y de la estructura cristalina por difracción de rayos X a la resolución de 2.8-Å de la ebulina I revelaron cambios en los aminoácidos clave de los subdominios de unión al azúcar de la cadena B, especialmente en el subdominio de alta afinidad de unión al azúcar  $2\gamma$  en el que el Tyr249 de ricina se cambia a Phe en la ebulina I (33). Esto reduce la afinidad de la ebulina por los galactósidos y, por lo tanto, por las glicoproteínas que contienen galactosa ubicadas en la superficie de la membrana plasmática.

### 3. COEXISTENCIA DE RIPS DE TIPO 1 Y 2

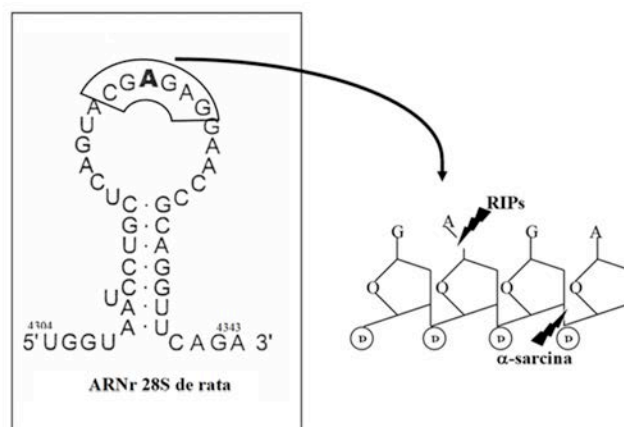
Las RIPS tipo 1 pueden coexistir con las de tipo 2 como se demostró en al menos en tres especies de *Sambucus* y posteriormente en *Cinnamomum camphora*, e *Iris hollandica*. Ello

sugiere que esta circunstancia podría ser reflejo de un fenómeno más general. Los frutos de *S. nigra* contienen las nigrinas tipo 1 f1 de naturaleza constitutiva y f2 de naturaleza inducible por maduración (34). Los estudios preliminares indicaron que ambas nigrinas se acumulan en la piel de los frutos, mientras que la nigrina RIP tipo 2 f está en el interior acuoso del fruto. Por otro lado, las hojas de *S. ebulus* contienen las ebulinas tipo 1,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (35). Dicha coexistencia de las RIPS de tipo 1 y tipo 2 se ha descrito en *Cinnamomum camphora* en la que se han descrito las RIPS cinamomina (tipo 2) y canforina (tipo 1), pero a diferencia de nigrinas y ebulinas, parece ser que canforina es de hecho la cadena A del cinamomina (36). *Iris hollandica* también contiene RIP de tipo 1 (IRIP 1,2,3) y tipo 2 (IRAb e IRAr, dos aglutininas con afinidad por Gal/N-acetilgalactosamina y manosa) (37). En la actualidad aún no se conoce el significado de la presencia simultánea de RIPS tipo 1 y tipo 2 en el mismo tejido.

### 4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE RIPS

Las RIPS muestran una serie de actividades enzimáticas, la mayoría de ellas pueden ser simplemente un reflejo de su actividad en el ARN y otras completamente nuevas. Estas actividades han sido revisadas recientemente (7,8,10). A pesar de la mayor parte de la investigación realizada sobre RIPS desde el descubrimiento de la ricina (3, 4) fue en 1987, cuando el grupo de Endo publicó el mecanismo molecular de acción de la ricina involucrado en la inhibición de la síntesis de proteínas (38) (figura 2).





<b>Animales</b>	
<i>Rattus norvegicus</i>	UGGUAAUCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<i>Homo sapien</i>	UGGUAAUCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<i>Xenopus laevis</i>	UAGUAAUCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<b>Levaduras</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UAGUAAUUGAACUCAGUACGAGAGGAACAGCAGGUUCGGA
<b>Plantas</b>	
<i>Cucumis melo</i>	CAGUAAUUAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCGGA
<i>Cucumis sativus</i>	UAGUAAUUAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCAGA
<i>Triticum aestivum</i>	CAGUAAUUAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCAGA
<i>Vicia sp.</i>	UAGUAAUUAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCAGA
<b>Bacteria</b>	
<i>Escherichia coli</i>	GGGGGCGUCUCCUAGUACGAGAGGACCGGAGUGGACGCA

Figura 2. Secuencia de nucleótidos del bucle altamente conservado del ARNr sobre el que actúan las RIPs. En la parte superior izquierda se muestra la estructura secundaria del ARNr 28S de rata en el cual la adenina (señalada en negrita) se elimina por acción de la RIP. En la parte inferior de la figura se muestran las secuencias homólogas pertenecientes a ribosomas sensibles a la acción de las RIPs. Los nucleótidos subrayados a la derecha de la adenina son complementarios de los situados a su izquierda (39).

Las RIPs son N-glicosidasas que rompen el enlace N-glicosídico que une el A<sub>4324</sub> con la cadena de polifosfato del ARNr 28S del ribosoma hepático de rata (Figura 2 superior) (38, 40). Esta adenina se encuentra en un bucle que está altamente conservado en las diferentes especies, llamado sitio de ricina/ $\alpha$ -sarcina que es esencial para la interacción de los factores de elongación G y 2 con los ribosomas procariota y eucariota, respectivamente, por esta razón la inactivación del ribosoma deja a la cadena polipeptídica naciente en el sitio A (2, 40). En esta línea, se ha demostrado que la estabilización de EF-G sobre ribosomas de *Escherichia coli* con el antibiótico ácido fusídico protege al ribosoma de la depuración por cotina 2, una RIP que inactiva los ribosomas bacterianos (41).

Muchas RIP inactivan también los ribosomas de insectos (42), hongos (43), bacterias (44-45) y plantas (46), a través de un mecanismo de acción similar que actúa en mamíferos (2). Aunque no hay estudios sistemáticos publicados sobre la sensibilidad de los ribosomas a las RIP, los datos disponibles indican que los ribosomas de mamíferos son mucho más sensibles que los ribosomas vegetales y bacterianos (2). Un examen de la sensibilidad relativa de los ribosomas de *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Streptomyces lividans* reveló que son sensibles a unos pocos RIP de tipo 1, pero no a otras, o a las

RIPs de tipo 2 intactas (2, 45-47). Esto ha obstaculizado la clonación molecular y la expresión de tales RIP inhibitorias en los sistemas comunes de expresión bacteriana (48, 49).

El bucle blanco para las RIPs es también el objetivo para otros inhibidores de la síntesis de proteínas como las RNasas de la familia de la  $\alpha$ -sarcina, a saber,  $\alpha$ -sarcina, restrictocina y tricolina (38, 40, 50, 51), que hidrolizan el enlace fosfodiéster en el extremo 3' del G<sub>4325</sub> del 28S ARNr. Algunas RIP promueven la liberación de una adenina por ribosoma, suficiente para inactivarlo, mientras que otros pueden liberar también otras adeninas del ribosoma, proceso este que no parece estar correlacionada con la capacidad inhibitoria de la RIP (52).

Se ha encontrado un nuevo tipo de enzima en algunas especies de plantas que producen RIPs, la llamada RALyasa. Esta enzima promueve de manera específica la hidrólisis del enlace fosfodiéster en el extremo 3'-terminal del sitio apurínico generado por la acción de la RIP autóloga. Se ha sugerido que este enzima podría formar parte de algún sistema de reparación del ARNr similar o equivalente al encontrado para la reparación del ADN (53-56), y que actuaría en los ribosomas que resultasen inactivados accidentalmente por las RIPs autólogas. Las RIP pueden eliminar las adeninas no solo de los ribosomas sino también de cualquier





tipo de ácido nucleico, a saber, ARNr, ARNt, ARNm, ARN viral e incluso ADN (57, 58). Tal actividad llevó a cambiar el nombre de las RIPs con la denominación más significativa y sistemática de las glicosilasas polinucleótidos de adenina (2). Esta actividad enzimática de sustrato amplio podría ser responsable de algunas propiedades que se han atribuido a las RIPs durante los últimos años, como la actividad antiviral, la promoción de la senescencia y la apoptosis por modificación del ADN (2, 7).

## 4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS NO ANTI-RIBOSOMICAS

### 4.1. Acción específica sobre el ARNm

Efectos específicos de las RIPs sobre el ARNm diferentes de la actividad de la adenina polinucleótido glicosilasa se han descrito recientemente para la PAP. PAP es capaz de unirse a las estructuras "cap" del mensajero y luego promover la depuración de ARNm en un sentido de 5'-3', inactivando así el ARNm (59). Esto permite que la PAP también regule el nivel de expresión de su propio ARNm (60).

### 4.2. Actividades de lipasa y trastorno de membranas

Las interacciones entre las RIPs y las membranas biológicas se han descrito en los últimos años. Las investigaciones más intensas se han realizado con ricina y proteínas relacionadas. Se ha descrito que la cadena A de ricina se une a vesículas de fosfolípidos cargadas negativamente y desestabiliza las bicapas lipídicas (61). El trabajo realizado con el cinnamomum RIP tipo 2 indica que la proteína forma canales catiónicos en las bicapas lipídicas (62). Estudios más recientes indicaron que la ricina muestra actividad de lipasa, que podría estar relacionada con la translocación a través de las membranas intracelulares (63). Tal actividad de lipasa parece estar relacionada con residuos específicos de aminoácidos pertenecientes tanto a la cadena A como a la B, y se ha argumentado que simplemente la mutación a alanina de la serina catalítica 221 en la cadena A redujo fuertemente la actividad de la lipasa de ricina (64). La ausencia de aminoácidos equivalentes en algunos RIP tipo 2 como la ebulina I y el VVA podría ser la base molecular de la falta o la menor toxicidad de tales proteínas en comparación con la ricina (64).

### 4.3. Enzimas bifuncionales

Se ha descrito que los cultivos celulares de *Trichosanthes kirilowii* producen enzimas bifuncionales de defensa vegetal con actividades de quitinasa y RIP (65). Hasta la fecha no hay más estudios sobre la aparición de las proteínas bifuncionales a pesar de la relevancia potencial de este nuevo tipo de proteína que podría desempeñar un papel en la resistencia a los patógenos fúngicos.

### 4.4. Inhibidores de otras enzimas

Las RIPs se han citado también como inhibidores de otras enzimas. Entre ellos se ha reportado la inhibición de la poli (ADP-ribosa) polimerasa involucrada en la reparación del ADN (66). Tal inhibición se ejerce sobre la fracción poli (ADP-ribosa) unida a la enzima, y se ha sugerido que tal efecto podría ser la base de las actividades transformadoras, apoptóticas y quizás antivirales atribuidas a algunos RIP. Otra enzima cuya actividad es inhibida por las RIPs es la integrasa del VIH-1. Lee-Huang y sus colegas encontraron que algunos RIP son capaces de inhibir las tres reacciones parciales involucradas en la actividad del VIH-1, a saber: i) procesamiento 3'-terminal; ii) Integración del ADNc vih-1 en el ADN aceptor; iii) desintegración del ADN pro-viral. (67-68). Otras actividades enzimáticas, que se ha informado que son sensibles a RIP como la telomerasa (69) y la superóxido dismutasa (70). Deben realizarse estudios adicionales para determinar si tales efectos son un atributo general de las RIPs o, en cambio, son simplemente peculiaridades.

## 5. INMUNOTOXINAS Y CONJUGADOS CONSTRUIDOS CON RIPs PARA LA TERAPIA DEL CANCER

La cirugía, radioterapia y quimioterapia constituyen las herramientas de la terapia clásica para el cáncer, pero resultan métodos muy agresivos a causa de los efectos colaterales. Para que estas terapias sean efectivas se requiere que las células malignas difieran suficientemente de las células normales, en su crecimiento o en su metabolismo, lo que no siempre sucede. Sin embargo, incluso en estos casos más desfavorables, las células tumorales expresan receptores de superficie u otras moléculas que las distinguen de los tejidos sanos. El objetivo de la terapia con inmunotoxinas es precisamente enviar selectivamente un agente citotóxico a estas moléculas de superficie con la finalidad de que las internalicen y provoquen la muerte celular (71-74).

Las inmunotoxinas químicas son conjugados formados por un ligando capaz de reconocer específicamente un tipo de células, y una toxina capaz de matar las células a las que se une el ligando. El ligando puede ser un anticuerpo monoclonal, una lectina, un factor de crecimiento, una hormona, un carbohidrato, o antígenos y receptores. En la figura 3 se representan esquemas de las inmunotoxinas, conjugados y especies recombinantes conteniendo RIPs o fragmentos activos de las mismas

Las inmunotoxinas químicas se construyen uniendo el ligando y la toxina mediante reacción química. La conjugación química de la RIP y la molécula conductora se realiza, por lo general, a través de puentes disulfuro reducibles insertados mediante agentes ligantes homobifuncionales (como el

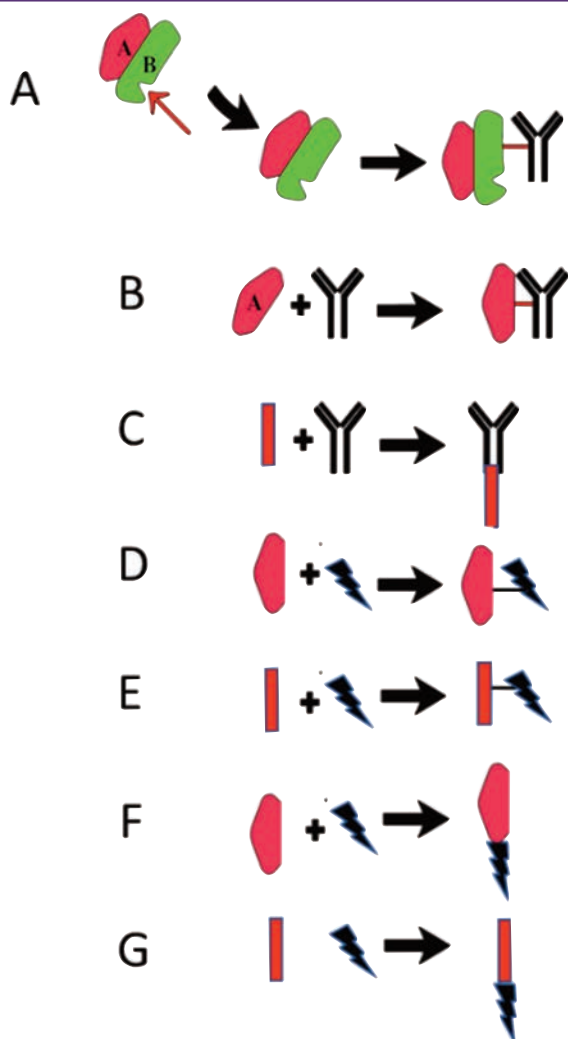


Figura 3. Inmunotoxinas y conjugados con RIPs intactas o sus fragmentos. A) inmunotoxinas con RIPs de tipo 2; B) inmunotoxinas con RIPs de una cadena; C) inmunotoxinas con fragmentos activos de RIPs; D) conjugado químico con moléculas conductoras, factores de crecimiento, etc.; E) Conjugados con moléculas conductoras, factores de crecimiento, etc.; F) Especies recombinantes con RIP intacta y moléculas conductoras, factores de crecimiento, etc.; G) Especies recombinantes con fragmentos activos de RIP y moléculas conductoras, factores de crecimiento, etc.

glutaraldehído o el dietilmalonimidato) o heterobifuncionales, como por ejemplo succinimidil-piridil-ditiopropionato (SPDP) y el 2-iminotiolano (2-IT). Con independencia del agente ligante empleado, la unión entre el ligando y la toxina debe ser suficientemente estable para permanecer intacta hasta que la inmunotoxina alcance las células blanco (75). Por otro lado, se han construido inmunotoxinas por vía de ADN recombinante en sus múltiples variantes (76), con RIPs clonadas en bacterias o levaduras, RIPs recombinantes con deleciones en la cadena, RIPs enteras o fragmentos derivados fundidas a moléculas conductoras, etc. Las moléculas conductoras pueden ser hormonas, factores de crecimiento, fragmentos de anticuerpos monoclonales, etc.

Aprovechando estas tecnologías se están mejorando las actividades farmacológicas de las RIPs (9, 10), así como las formas de administración para mejorar la interacción con las células (77). El mecanismo general de acción en las inmunotoxinas que tienen como blanco la biosíntesis de proteínas es el mismo en todas ellas. La inmunotoxina o conjugado se une a la célula blanco, se internaliza por endocitosis mediada por receptor y la parte toxica (RIP) es liberada al citosol donde inactiva los ribosomas provocando la muerte de la célula (75). Cada inmunotoxina o conjugado sigue una ruta intracelular distinta en función del elemento conductor que utilice, hasta el punto de que una misma inmunotoxina puede seguir diferentes rutas dependiendo de la línea celular tratada, lo que se traduce en distintas tasas de degradación del conjugado y, por tanto, en distinta toxicidad (78, 79). Además, la ruta puede ser independiente de la toxina, es el caso de algunos compuestos dirigidos frente al receptor de transferrina (80).

La eficacia de una inmunotoxina depende del antígeno de la superficie celular al que va dirigida. En primer lugar, para que el conjugado sea lo más específico posible, se eligen antígenos que tengan una expresión elevada en tumores y una expresión restringida en tejidos normales. Estos blancos deben ser accesibles al conjugado y no encontrarse en forma soluble o tratarse de moléculas minoritarias, con el fin de que se fije la máxima cantidad de inmunotoxina a las células blanco (75). En la eficacia de una inmunotoxina también influye su estabilidad y la capacidad para penetrar en el tumor (81). Los compuestos de menor tamaño acceden con mayor facilidad al interior del tumor, pero se eliminan fácilmente a través del riñón (75). Por otro lado, la vida media de las inmunotoxinas en el suero está muy relacionada con su tasa de eliminación por el sistema retículo-endotelial, la cual se ve favorecida por la presencia de carbohidratos en la proteína (75). Recientemente, se han obtenido conjugados con diversas RIPs de tipo 1, tanto nativas como recombinantes. Como ejemplos se pueden citar entre otras saporin 6, momordin I, PAP, gelonin, RIP de cebada, bryodin, etc., (82-84). Entre las inmunotoxinas construidas podemos destacar las inmunotoxinas contra la neovascularización tumoral que tienen la ventaja de atacar los vasos que nutren el tumor sólido en vez de las células tumorales. La destrucción de estos vasos promueve un efecto multiplicador destructivo que aumenta la eficacia de la inmunotoxina. Entre las RIPs utilizadas se encuentran ricina (85) y RIPs de tipo 2 del género *Sambucus* (86). Las inmunotoxinas también se han empleado en la terapia experimental contra el SIDA dirigiéndolas hacia diferentes regiones de la cubierta glicoproteínica del VIH o hacia antígenos de superficie (87, 88).

La nanoencapsulación de diversas RIPs en distintos nanovectores bioselectivos, permite aumentar la biodistribución de la toxina, alcanzando biofase con menor riesgo de efectos adversos



incontrolados y facilitar la posología en pacientes oncológicos, mediante el control de la liberación. Aunque el mayor número de estudios con estos sistemas se centran en cáncer, es de destacar su uso en patologías infecciosas (SIDA) o autoinmunes. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un vector oral para la optimización del tratamiento con corticoides de la enfermedad de Crohn, tanto en fase de brote como en periodos intermedios. Dicho sistema ha sido formulado en base a diversos polímeros bioadhesivos para aumentar su tiempo de residencia en la mucosa intestinal. Además, debido a su funcionalización con cadenas con actividad lectina (B), es capaz de dirigirse de manera específica a tejido inflamado mediante el reconocimiento específico a receptores celulares sobreexpresados en células afectadas (datos no publicados).

## 6. INVESTIGACIÓN FUTURA

La investigación sobre las RIPs ha recibido especial atención en los últimos años debido a su interés intrínseco como componentes de mecanismos biológicos desconocidos y también a su uso como partes tóxicas de conjugados e inmunotoxinas para la terapia dirigida de enfermedades importantes. Hay una serie de preguntas abiertas sobre el papel desempeñado por las RIPs en los organismos productores y sobre su uso para aplicaciones médicas. El papel recientemente descrito para PAP como un componente del sistema de lectura compleja de ARNm en plantas, junto con el papel intrínseco antipatógeno atribuido a las RIPs en los últimos tiempos añaden más interés aún a estas enzimas. La variación de las concentraciones de RIP en diferentes tejidos y la presencia de isoformas de RIP podría tener relación en el desarrollo de las plantas. En cuanto al mecanismo de acción molecular de las RIPs, la amplia especificidad de muchos RIP en ribosomas de mamíferos, plantas y bacterias plantea la cuestión de si las RIPs contienen dominios catalíticos y de unión específicos para los diferentes ribosomas, ARNm e incluso ADN. Dado que muchos RIP no inhiben la síntesis de proteínas en bacterias y en plantas, su clonación y expresión y la construcción de plantas transgénicas resistentes a hongos y virus facilitarán la elucidación de las relaciones estructura-función RIP. La investigación futura intentará abordar todas estas (y otras) preguntas relacionadas con la función biológica de las RIPs.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrams P, Blaivas JG, Stanto SL, Andersen JT. The standardization of terminology of lower urinary tract function. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1988; 114:5-19.
1. Jiménez A, Vázquez D. Plant and fungal protein and glycoprotein toxins inhibiting eukaryote protein synthesis. *Annu Rev Microbiol* 1985; 39: 649-72.
2. Girbes T, Ferreras JM, Arias FJ, et al. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Reviews Med Chem* 2004; 4(5): 461-76.
3. Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon* 2013; 67: 12-6.
4. Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, et al. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. *Molecules* 2016; 21(12): art. 1627.
5. Fabbri MS, Katayama M, Nakase I, et al. Plant Ribosome-Inactivating Proteins: Progresses, Challenges and Biotechnological Applications (and a Few Digressions). *Toxins* 2017; 9(10): art. 314.
6. Schrot J, Weng A, Melzig MF. Ribosome-Inactivating and Related Proteins. *Toxins* 2015; 7(5): 1556-15.
7. Akkouch O, Ng TB, Cheung RCF, et al. Biological activities of ribosome-inactivating proteins and their possible applications as antimicrobial, anticancer, and anti-pest agents and in neuroscience research. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(23): 9847-63.
8. Jain M, Amera GM, Muthukumar J, et al. Insights into biological role of plant defense proteins: A review. *Biocatalysis Agric Biotechnol* 2022; 40: art. 102293.
9. Lu JQ, Zhu ZN, Zheng YT, et al. Engineering of Ribosome-inactivating Proteins for Improving Pharmacological Properties. *Toxins* 2020; 12(3): art. 167.
10. Sharma A, Gupta S, Sharma NR, et al. Expanding role of ribosome-inactivating proteins: From toxins to therapeutics. *IUBMB Life*. Disponible en: (<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.2675>)
11. Dougherty K, Hudak KA. Phylogeny and domain architecture of plant ribosome inactivating proteins. *Phytochemistry* 2022; 202: 113337.
12. Montanaro L, Sperti S, Stirpe F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem J* 1973; 136(3): 677-83.
13. Girbés T, Citores L, Ferreras JM, et al. Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol Biol* 1993; 22: 1181-6.
14. Girbés T, Citores L, Iglesias R, et al. Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J Biol Chem* 1993; 268(24): 18195-9.
15. Walsh TA, Morgan AE, Hey TD. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J Biol Chem* 1991; 266(34): 23422-7.
16. Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, et al. JIP60, a methyl jas-



- monate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(15): 7012-6.
17. Mishra V, Mishra R, Shamra RS. Ribosome inactivating proteins - An unfathomed biomolecule for developing multi-stress tolerant transgenic plants. *Int J Biol Macromol* 2022; 210: 107-22.
18. Van Damme EJ, Roy S, Barre A, et al. Elderberry (*Sambucus nigra*) bark contains two structurally different Neu5Ac(alpha2,6)Gal/GalNAc-binding type 2 ribosome-inactivating proteins. *Eur J Biochem* 1997; 245(3): 648-55.
19. Van Damme EJ, Barre A, Rougé P, et al. Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (*Sambucus nigra*) bark. *J Biol Chem* 1997; 272(13): 8353-60.
20. de Benito FM, Citores L, Iglesias R, et al. Isolation and partial characterization of a novel and uncommon two-chain 64-kDa ribosome-inactivating protein from the bark of elder (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett* 1997; 413(1): 85-91.
21. Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M, et al. Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett* 2001; 505(1): 196-7.
22. Ferreras JM, Barbieri L, Girbés T, et al. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim Biophys Acta* 1993; 1216(1): 31-42.
23. Zhu F, Zhou YK, Ji ZL, et al. The plant ribosome-inactivating proteins play important roles in defense against pathogens and insect pest attacks. *Front Plant Sci* 2018; 9: 146. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00146/full>.
24. Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, et al. Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett* 1996; 382(3): 309-12.
25. Girbés T, de Torre C, Iglesias R, et al. RIP for viruses. *Nature* 1996; 379: 777-8.
26. Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE, et al. Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol Biol* 1997 Dec; 35(6): 701-9.
27. Sandvig K, van Deurs B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* 2002; 529(1): 49-53.
28. Chan YS, Ng TB. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100(4): 1597-610.
29. Wang HX, Ng TB. Isolation of pleutregin, a novel ribosome-inactivating protein from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288(3): 718-21.
30. Lam SK, Ng TB. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(4): 1071-5.
31. Liu RS, Yang JH, Liu WY. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). *Eur J Biochem* 2002; 269(19): 4746-52.
32. Svinth M, Steighardt J, Hernandez R, et al. Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(3): 637-42.
33. Pascal JM, Day PJ, Monzingo AF, et al. 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins* 2001; 43: 319-26.
34. de Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, et al. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett* 1998; 428(1-2): 75-9.
35. de Benito FM, Citores L, Iglesias R, et al. Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin I. *FEBS Lett* 1995; 360(3): 299-302.
36. Ling J, Liu WY, Wang TP. Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora*--characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1252(1): 15-22.
37. Hao Q, Van Damme EJ, Hause B, et al. Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties. *Plant Physiology* 2001; 125(2): 866-76.
38. Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem* 1988; 263(18): 8735-9.
39. Girbes T. Lectinas: herramientas para el tercer código biológico. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia como Académico de Número. Disponible en: <https://ranf.com/wp-content/uploads/academicos/discursos/numero/girbes.pdf>.
40. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 1987; 262(12): 5908-12.
41. Iglesias R, Escarmis C, Alegre C, et al. Fusidic acid-dependent ribosomal complexes protect *Escherichia coli* ribosomes from the action of the type 1 ribosome-inactivating protein crotin 2. *FEBS Lett* 1993; 318(2): 189-92.
42. Ferrari C, Barbieri L, Stirpe F. Effects of plant ribosome-inactivating proteins on ribosomes from *Musca domestica*. *Comp Biochem Physiol* 1991; 100B(2): 223-7.
43. Park SW, Stevens NM, Vivanco JM. Enzymatic Specificity of Three Ribosome-Inactivating Proteins against Fungal Ribosomes, and Correlation with Antifungal Activity. *Planta* 2002; 216(2): 227-34.
44. Girbés T, Barbieri L, Ferreras M, et al. Effects of ribosome-inactivating





- proteins on *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* translation systems. *J Bacteriol* 1993; 175(20): 6721-4.
45. Ferreras JM, Iglesias R, Barbieri L, et al. Effects and molecular action of ribosome-inactivating proteins on ribosomes from *Streptomyces lividans*. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243(1): 85-93.
46. Iglesias R, Arias FJ, Rojo MA, et al. Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Lett* 1993; 325(3): 291-4.
47. Ferreras JM, Alegre C, Iglesias R, et al. Characterization of a cell-free translation system from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochem Soc Trans* 1992; 20(4): 314S.
48. Habuka N, Akiyama K, Tsuge H, et al. Expression and secretion of *Mirabilis* antiviral protein in *Escherichia coli* and its inhibition of in vitro eukaryotic and prokaryotic protein synthesis. *J Biol Chem* 1990; 265(19): 10988-92.
49. Hartley MR, Legname G, Osborn R, et al. Single-chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *FEBS Letters* 1991; 290(1-2): 65-68.
50. Endo Y, Wool IG. The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem* 1982; 257(15): 9054-60.
51. López-Otín C, Barber D, Fernández-Luna JL, et al. The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur J Biochem* 1984; 143(3): 621-34.
52. Barbieri L, Ferreras JM, Barraco A, et al. Some ribosome-inactivating proteins depurinate ribosomal RNA at multiple sites. *Biochem J* 1992; 286: 1-4.
53. Sawasaki T, Morishita R, Ozawa A, et al. Mechanism of ribosome RNA apurinic site specific lyase. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 42: 257-8.
54. Ogasawara T, Sawasaki T, Morishita R, et al. A new class of enzyme acting on damaged ribosomes: ribosomal RNA apurinic site specific lyase found in wheat germ. *The EMBO Journal* 1999; 18(22): 6522-31.
55. Ito Y, Ozawa A, Sawasaki T, et al. OsRALyase1, a putative F-box protein identified in rice, *Oryza sativa*, with enzyme activity identical to that of wheat RALyase. *Biosci Biotech Biochem* 2002; 66(12): 2727-31.
56. Pelosi E, Lubelli C, Polito L, et al. Ribosome-inactivating proteins and other lectins from *Adenia* (Passifloraceae). *Toxicon* 2005; 46(6): 658-63.
57. Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, et al. Unexpected activity of saporins. *Nature* 1994; 372(6507): 624.
58. Brigotti M, Alfieri R, Sestili P, et al. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *The FASEB Journal* 2022; 16: 365-72.
59. Hudak KA, Bauman JD, Tumer NE. Pokeweed antiviral protein binds to the cap structure of eukaryotic mRNA and depurinates the mRNA downstream of the cap. *RNA* 2002; 8(9): 1148-59.
60. Parikh BA, Coetzer C, Tumer NE. Pokeweed antiviral protein regulates the stability of its own mRNA by a mechanism that requires depurination but can be separated from depurination of the alpha-sarcin/ricin loop of rRNA. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41428-37.
61. Day PJ, Pinheiro TJ, Roberts LM, et al. Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry* 2002; 41(8): 2836-43.
62. Zhang GP, Shi YL, Wang WP, et al. Cation channel formed at lipid bilayer by Cinnamomin, a new type II ribosome-inactivating protein. *Toxicon* 1999; 37(9): 1313-22.
63. Lombard S, Helmy ME, Piéroni G. Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem J* 2001; 358: 773-81.
64. Morlon-Guyot J, Helmy M, Lombard-Frasca S, et al. Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 17006-11.
65. Remi Shih N, McDonald K, Jackman A, et al. Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Sci* 1997; 130(2): 145-50.
66. Barbieri L, Brigotti M, Perocco P, et al. Ribosome-inactivating proteins depurinate poly(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. *FEBS Letters* 2003; 538(1-3): 178-82.
67. Lee-Huang S, Kung HF, Huang PL, et al. A new class of anti-HIV agents: GAP31, DAPs 30 and 32. *FEBS Lett* 1991; 291(1): 139-44.
68. Lee-Huang S, Huang PL, Kung HF, et al. TAP 29: an anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(15): 6570-4.
69. Lyu SY, Choi SH, Park WB. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 93-101.
70. Li XD, Chen WF, Liu WY, et al. Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins - Cinnamomin and camphorin from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Prot Express Purific* 1997; 10(1): 27-31.
71. Gilibert-Oriol R, Weng A, von Mallinckrodt B, et al. Immunotoxins Constructed with Ribosome-Inactivating Proteins and their Enhancers: A Lethal Cocktail with Tumor Specific Efficacy. *Current Pharmaceutical Design* 2014; 20(42): 6584-43.
72. Pizzo E, di Maro A. A new age for biomedical applications of Ribosome Inactivating Proteins (RIPs): from bioconjugate to nanoconstructs. *J Biomed Sci* 2016; 23: art 54.





73. Temaj G, Chichiarelli S, Eufemi M, et al. Ribosome-Directed Therapies in Cancer. *Biomedicines* 2022; 10; 2088.
74. Flavell DJ, Flavell SU. Plant-Derived Type I Ribosome Inactivating Protein-Based Targeted Toxins: A Review of the Clinical Experience 2022; 14; art. 563.
75. Brinkmann U, Pastan I. Immunotoxins against cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198(1): 27-45.
76. Mahmoudi R, Dianat-Moghadam H, Poorebrahim M, et al. Recombinant immunotoxins development for HER2-based targeted cancer therapies. *Cancer Cell Int* 2021; 21: 470. art. 470.
77. Chen YZ, Zhang M, Min KA, et al. Improved Protein Toxin Delivery Based on ATTEMPTS Systems. *J Drug Targ* 2018; 19(4); 380-92.
78. Battelli MG, Citores L, Buonamici L, et al. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Arch Toxicol* 1997; 71(6): 360-4.
79. Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, et al. Sensitivity of cancer cell lines to the novel non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b, *Cancer Letters* 2001; 167(2): 163-9.
80. Citores L, Ferreras JM, Muñoz R, et al. Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin I. *Cancer Letters* 2002; 184(1): 29-35.
81. Rostaing-Capaillon O, Casellas P. In vivo cytotoxic efficacy of immunotoxins prepared from anti-CD5 antibody linked to ricin A-chain. *Cancer Immunol Immunother* 1991; 34(1): 24-30.
82. Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng* 2007; 24(2): 201-15.
83. Khirehgesh MR, Sharifi J, Safari F, et al. Immunotoxins and nanobody-based immunotoxins: review and update. *J Drug Targ* 2021; 29(8), 848-62.
84. Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins: From Design to Clinical Application. *Biomolecules* 2021; 11(11): 1696
85. Seon BK, Matsuno F, Haruta Y, et al. Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res* 1997; 3(7): 1031-44.
86. Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, et al. Use of Ribosome-Inactivating Proteins from *Sambucus* for the Construction of Immunotoxins and Conjugates for Cancer Therapy. *Toxins* 2011; 3(5): 420-4.
87. Zarling JM, Moran PA, Haffar O, et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal-antibodies. *Nature* 1990; 347(6288): 92-95.
88. Pincus SH, Song K, Maresh GA, et al. Identification of Human Anti-HIV gp160 Monoclonal Antibodies That Make Effective Immunotoxins. *J Virol* 2017; 91(3). art. 01955.

Si desea citar nuestro artículo:

**Proteínas inactivadoras de ribosomas: enzimas en busca de función biológica**

Tomás Gírbés Juan y Damián Córdoba Díaz

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 477-487

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.15>



## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES LIQUÉNICAS

### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LICHEN SPECIES

**María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado**

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid

**corresponding author:** pserra@ucm.es

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

El interés farmacológico de los líquenes radica en su capacidad para producir metabolitos secundarios bioactivos, siendo la mayoría de estos metabolitos, compuestos fenólicos con grupos hidroxilo reactivos que les confieren potencial antioxidante a través de diversos mecanismos. El aumento de la incidencia y el impacto de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, entre ellas los trastornos neurodegenerativos, ha fomentado la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas que permitan su control. La información recopilada en esta revisión proviene de investigaciones *in vitro*, sobre sustratos celulares y en modelos animales que permiten afirmar que los líquenes constituyen, en el campo de los productos naturales, una fuente prometedora de compuestos, muchos de ellos fenólicos, con actividad antioxidante.

#### ABSTRACT

*The pharmacological interest of lichens lies in their ability to produce bioactive secondary metabolites, being most of them phenolic compounds with reactive hydroxyl groups which confer antioxidant potential through multiple mechanisms. The increasing incidence and impact of oxidative stress-related diseases, including neurodegenerative disorders, has promoted the search of new pharmacological strategies for control purposes. The information compiled in this review comes from in vitro research, on cell substrates and animal models, which allows us to affirm that lichens constitute, in the field of natural products, a promising source of compounds, many of them phenolic, with antioxidant activity.*

#### Palabras Clave:

líquenes  
farmacología  
antioxidante  
metabolitos secundarios

#### Keywords:

lichens  
pharmacology  
antioxidant  
secondary metabolites

## 1. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos compuestos por un hongo y un alga y/o cianobacteria. No se trata de organismos individuales sino de una simbiosis que funciona en la naturaleza como una unidad, y en la que los tejidos del hongo (micobionte) generalmente rodean al alga y/o la cianobacteria fotosintética (fotobiontes). Se acepta como definición de consenso la facilitada por Hawksworth y Honegger (1), según la cual los líquenes son "ecologically obligate, stable mutualism between an exhabitant fungal partner (the mycobiont) and an inhabitant population of extracellularly located unicellular or filamentous algal and/or cyanobacterial cells (the photobiont)". Existe, sin embargo, una amplia variabilidad en las relaciones que se establecen entre el hongo y el alga (o cianobacteria), ya que pueden existir dos, tres, cuatro o incluso más simbiontes en el mismo organismo; por ello, ha habido intenso debate en torno a la definición de "líquen". Además, no están considerados como un grupo taxonómico propio, sino que su taxonomía se basa en la clasificación del componente fúngico dominante o micobionte. Por tanto, y a pesar de que pueden incluir individuos de tres reinos distintos, las simbiosis líquénicas pertenecen, desde un punto de vista filogenético, al reino *Fungi*.

Entre los usos etnomedicinales de las especies líquénicas, cabe destacar el empleo de *Lobaria pulmonaria* para el tratamiento de enfermedades respiratorias, y también como cicatrizante y anti-séptico; *Xanthoria parietina*, de color amarillo, se utilizaba para tratar la ictericia; *Parmelia sulcata* en afecciones craneales; distintas especies de *Usnea* usadas para fortalecer el cabello y evitar su caída;

*Peltigera aphthosa* se recomendaba como vermífugo y para tratar úlceras (en especial, llagas en la mucosa bucal en los niños) y el líquen islándico (*Cetraria islandica*), uno de los más utilizados en medicina tradicional, al que se le atribuían propiedades beneficiosas en enfermedades pulmonares, de riñón y vejiga, en inflamación de mucosas o incluso para el tratamiento del cáncer (2). Incluso en los últimos años, se ha incluido en la Farmacopea Europea.

En España, la medicina tradicional recoge el empleo de *Pseudevernia furfuracea* para el tratamiento de enfermedades respiratorias y de *Ramalina bourgeana* con fines diuréticos.

Al tratarse de una asociación de dos organismos diferentes (alga y hongo, ya mencionados), los líquenes presentan una composición química particular y compleja, puesto que ambos organismos en asociación tienen diferentes componentes. Se han identificado más de 1050 compuestos procedentes de líquenes, habiéndose clasificado, de forma general los metabolitos líquénicos en tres grandes grupos: compuestos alifáticos, compuestos aromáticos y carbohidratos o polisacáridos. Más recientemente, se han propuesto clasificaciones basadas en sus estructuras químicas, clasificando así los principales metabolitos secundarios en: Compuestos fenólicos monocíclicos (derivados del orcinol/ácido orselínico y  $\beta$ -orcinol), Depsidas (atranorina, ácido barbático, entre otros), Depsidonas (ácido protocetrárico o ácido salazínico), Dibenzofuranos (ácido úsnico), Quinonas (parietina, liquexantona), Derivados del ácido vulpínico (ácido vulpínico) y Ácidos alifáticos o lactonas, como el ácido proto-liquesterínico (Figura 1). Además, se ha detectado la presencia de compuestos como ésteres de escabrosina, derivados de aminoácidos, xantona-glucósidos y algunos carotenoides y terpenoides.

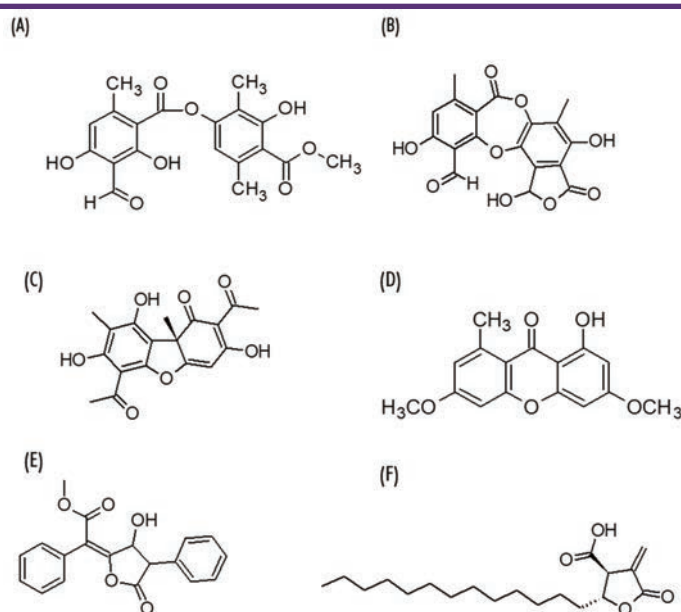


Figura 1. Estructuras de metabolitos secundarios de líquenes: (A) atranorina, (B) ácido salazínico, (C) (+)-ácido úsnico, (D) liquexantona, (E) ácido vulpínico y (F) ácido proto-liquesterínico.

La importancia farmacológica de los líquenes radica en su capacidad para producir estos metabolitos secundarios, muchos de los cuales solo aparecen en estos hongos liquenizados. Entre ellos, los compuestos fenólicos anteriormente citados son los metabolitos secundarios más relevantes, además de ser los metabolitos mejor estudiados. En la Figura 1 se muestran las estructuras químicas de algunos de los compuestos más representativos de los grupos anteriormente mencionados.

Tanto los compuestos liquénicos como los extractos que los contienen, han demostrado un amplio rango de actividades biológicas con interés farmacológico, entre ellas, las más estudiadas incluyen: antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatoria, analgésica/antipirética, actividad inhibitoria de enzimas y efectos antiproliferativos y citotóxicos (3). El estudio sistemático de las propiedades farmacológicas, tanto de los extractos como de los componentes liquénicos, ha comenzado recientemente, siendo los resultados obtenidos hasta el momento de gran interés, lo que ha hecho aumentar este campo de investigación. Los géneros mejor estudiados desde el punto de vista farmacológico son *Parmelia* y *Usnea*. Si nos referimos a especies, las de mayor interés hasta el momento son *Cetraria islandica*, *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea* por ser aquellas con las que se han realizado un mayor número de estudios (4) (Figura 2)

En la Tabla 1 se recogen los principales metabolitos identificados en líquenes parmeliáceos de los que se ha estudiado alguna actividad farmacológica.

En los últimos años, se ha observado un incremento en el interés por la búsqueda de nuevos productos naturales que puedan ser activos en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, con especial atención a las enfermedades neurodegenerativas

y, por lo tanto, en encontrar compuestos con potencial neuroprotector basado en su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo (5). La capacidad antioxidante de los líquenes y sus metabolitos bioactivos es la propiedad que más directamente se relaciona con el potencial neuroprotector de los productos naturales. La naturaleza polifenólica de un gran número de metabolitos secundarios presentes en los líquenes sugiere que pueden ejercer efectos antioxidantes frente a especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno, habiéndose sugerido en diversas revisiones científicas que los líquenes son una fuente interesante de productos naturales con capacidades antioxidantes (6,7).

El objetivo marcado en este artículo de revisión ha sido recopilar la información publicada sobre las propiedades antioxidantes de los líquenes y sus metabolitos secundarios aislados a fin de aportar nuevos conocimientos con el fin de facilitar y orientar futuras investigaciones sobre estos productos naturales.

## 2. ESTRÉS OXIDATIVO

El término "estrés oxidativo" (EO) hace referencia a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas (ER) y las defensas antioxidantes a nivel celular (8). Hace ya casi cuatro décadas, Sies lo definía como una "alteración en el balance pro-oxidante/antioxidante a favor del primero, que lleva a un potencial daño" (9). Los radicales libres, incluidas las especies reactivas del oxígeno, como el radical hidroxilo, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y las especies reactivas del nitrógeno, como el óxido nítrico, desempeñan, en condiciones fisiológicas, funciones importantes en muchos procesos celulares; sin embargo, también están asociados con procesos patológicos y de daño celular. El estrés oxidativo se de-



Figura 2. Especímenes representativos de las especies *Evernia prunastri* (A), y *Vulpicida canadensis* (B).





**Tabla 1.** Principales metabolitos identificados en líquenes parmelíaceos de los que se ha estudiado alguna actividad farmacológica.

Metabolito	Tipo de estructura	Nº de especies en que se ha identificado	Actividades farmacológicas estudiadas
Etil-hematomato	Compuesto fenólico monocíclico	2	Actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica
Ácido evérnico	Depsida	3	Actividad antioxidante, antimicrobiana y antitumoral/citotóxica
Ácido girofórico	Depsida	2	Actividad antimicrobiana y citotóxica
Ácido 3-hidroxi-fisódico	Depsidona	2	Actividad antimicrobiana, citotóxica y protectora frente a daño citogenético
Isoliquenano y liquenano	Polisacáridos	2	Actividad anti-tumoral
Ácido lecanórico	Depsida	3	Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica
Metil-hematomato	Compuesto fenólico monocíclico	2	Actividad antioxidante y antimicrobiana
Ácido olivetórico	Depsida	2	Actividad anti-angiogénica y antimicrobiana
Ácido fisodálico	Depsidona	1	Actividad citotóxica y protectora frente a daño citogenético
Ácido fisódico	Depsidona	5	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y protectora frente a daño citogenético
Ácido protocetrárico	Depsidona	2	Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica
Ácido protoliquesterínico	Ácido alifático	5	Actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, citotóxica, anti-VIH e inhibitoria de enzimas
Ácido psorómico	Depsidona	2	Actividad antioxidante, citotóxica y cardioprotectora
Ácido salazínico	Depsidona	6	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y cicatrizante
Ácido úsnico	Dibenzofurano	23	Actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, anti-leishmania, citotóxica, cardioprotectora, hepatoprotectora y cicatrizante

fine como un desequilibrio entre los procesos bioquímicos que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los responsables de su eliminación, los denominados antioxidantes. En la situación de estrés oxidativo, los radicales libres podrán causar daño a los ácidos nucleicos y las proteínas, así como los ácidos grasos insaturados de la membrana celular (10, 11).

En condiciones fisiológicas, las células del organismo se encuentran protegidas frente al daño derivado del estrés oxidativo por los sistemas de defensa, entre los que se incluyen sistemas enzimáticos y no enzimáticos, los cuales actúan a través de diversos mecanismos, como son la capacidad de captación y posterior degradación de las ERO, la prevención de la generación de ERO, la cap-

tación de iones metálicos que catalizan reacciones que involucran a las ERO, y capacidad para potenciar la actividad y activar la expresión de enzimas antioxidantes. Así pues, los agentes antioxidantes inhiben y previenen aquellas ROS que pueden causar enfermedades degenerativas. Cabe recordar que muchos antioxidantes sintéticos han generado efectos tóxicos y/o mutagénicos (12,13), por lo que la búsqueda de antioxidantes naturales es un campo de investigación científica de interés. En las últimas décadas, diversos estudios han puesto de manifiesto las capacidades antioxidantes de numerosos compuestos naturales en modelos *in vitro* e *in vivo* de patologías relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas. Sobresalen, entre ellos, los com-



puestos polifenólicos, tanto por su diversidad de estructuras existentes como por sus efectos. Entre estos compuestos destacan los flavonoides y otros compuestos fenólicos como los derivados hidroxicinámicos, las catequinas, las teaflavinas, las curcuminas y los terpenoides (14). En su mayoría son compuestos fenólicos que contienen grupos hidroxilo que pueden reaccionar fácilmente, basándose sus propiedades antioxidantes en su capacidad para capturar ROS, quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, estabilizar electrones desapareados y modular los sistemas de defensa antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos.

En las últimas décadas, se ha descrito la implicación del estrés oxidativo en numerosas patologías, entre las que se encuentran la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Actualmente, existe un amplio consenso científico, basado en sólidas investigaciones, sobre la implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras.

En este sentido, la estrategia más común desarrollada hasta la fecha para combatir los elevados niveles de ERO en neuronas ha sido el estudio de compuestos antioxidantes, cuyo aporte exógeno permita combatir el EO por los diversos mecanismos antioxidantes anteriormente mencionados: captación directa de ERO, quelación de iones metálicos, potenciación de la actividad de enzimas antioxidantes e inhibición de enzimas pro-oxidantes como NOS y mieloperoxidasa, entre otros.

Como ya se ha comentado anteriormente, en las últimas décadas, ha cobrado especial relevancia la investigación de los productos naturales con propiedades antioxidantes, motivado en parte por cuestiones de seguridad y toxicidad de los antioxidantes sintéticos, con el objetivo de lograr moléculas que permitan intervenir en la etiología o progresión de la enfermedad a través del uso individual o combinado de moléculas capaces de mejorar los procesos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos endógenos (11). Así pues, resulta de gran interés la investigación del potencial antioxidante de los líquenes, y, más concretamente, de sus metabolitos secundarios como estrategia futura para la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Los mecanismos y vías detalladas involucrados en la actividad antioxidante de los líquenes se encuentran en investigación y su conocimiento ayudará a comprender la farmacología de estos metabolitos secundarios y sus posibilidades en el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos, promoviendo así el desarrollo de productos naturales neuroprotectores.

### 3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS LÍQUENES

Diversos extractos de líquenes y metabolitos secundarios han sido estudiados por sus propiedades antioxidantes debido a su contenido fenólico; por ejemplo, se han demostrado las actividades antioxidantes de algunos depsidos y depsidonas aisladas de varias especies de líquenes (15,16), así como las propiedades *in vitro* de algunos extractos de líquenes. Además, se han realizado también estudios centrados en la modulación de ROS intracelulares por metabolitos/extractos de liquen y sus efectos *in vivo*. La tabla 2 recoge la actividad antioxidante observada mediante ensayos *in vitro* de algunos líquenes parmeliáceos y sus metabolitos aislados.

Respecto a los metabolitos secundarios, son muy recientes las primeras aproximaciones a su potencial efecto neuroprotector a nivel del sistema nervioso central. El estudio realizado por de Paz et al. (15) demostró que ciertos poliquétidos, como los ácidos estíctico, salazínico y úsnico, presentan un interesante efecto antioxidante, aumentando la viabilidad celular. Del mismo modo, la depsida atranorina demostró un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo.

Luo y colaboradores (17) abordaron por primera vez la búsqueda en líquenes de metabolitos secundarios con aplicación terapéutica frente a la enfermedad de Alzheimer. Para ello realizaron un screening de bioactividad en 109 extractos liquénicos, identificaron en un extracto de *Cladonia macilenta* la biruloquinona (previamente aislado en *Parmelia birulae*, de *Parmeliaceae*), este compuesto actúa como un potente inhibidor de acetilcolinesterasa y demostró un interesante efecto citoprotector en un modelo neuronal frente a la toxicidad ejercida por el péptido A $\beta$  25-35 y frente a estrés oxidativo, sugiriendo actividad como un agente multi-funcional. En esta línea, nuestro grupo ha publicado resultados interesantes para varios líquenes parmeliáceos frente al estrés oxidativo en modelos celulares de SNC (se incluyen *Cetraria islandica*, *Vulpicida canadensis*, *Cetrelia braunsiana*, *Parmotrema saccatilobum* y *Usnea ghattensis*), así como la identificación de sus principales compuestos bioactivos. Por último, se ha demostrado el potencial de los metabolitos liquénicos en el SNC, al revelar las propiedades neuroactivas de atranorina, ácido perlatórico y ácido fisódico; estos poliquétidos ejercen propiedades neurotróficas, neurogénicas e inhibitorias de acetilcolinesterasa *in vitro* y *ex vivo* (18, 19).

En Tabla 3 se recogen los estudios *in vivo* que evalúan parámetros sobre propiedades antioxidantes de líquenes. En general, la actividad antioxidante se ha evaluado principalmente en función de algunos ensayos químicos, como la inhibición de peroxidación lipídica y la actividad de enzimas antioxidantes y otros marcadores de actividad antioxidante. El metanol resultó ser uno de los solventes más utilizados para la extracción eficiente de los compuestos



**Tabla 2.** Estudios en cultivos celulares in vitro sobre propiedades antioxidantes de líquenes

Especie / Compuesto aislado	Solvente / Origen	Línea celular	Inhibición de peroxidación lipídica	Marcadores de actividad antioxidante	Referencia
Atranorina	Comercial	Línea celular SH-SY5Y modelo de neuronas humanas	↑ Peroxidación lipídica inducida por radicales peroxilo <i>in vitro</i>	Buena capacidad antioxidante en ensayos de TRAP ( <i>total reactive antioxidant potential</i> ) y TAR ( <i>total antioxidant potential</i> ) ↑ Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y NO, y la actividad captadora del radical O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ↑ Protección de las células SH-SY5Y frente a la reducción de viabilidad celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	48
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	Metanol	Linfocitos humanos	↓ Niveles de MDA	↑ Actividad de las enzimas SOD y GPx	49
Ácido difractaico	<i>Protousnea magellanica</i> (Mont.) Krog	Células HeLa (procedentes de cáncer cérvico-uterino humano)	No estudiado	Sin efecto significativo en los niveles intracelulares de ERO No ejerce protección frente al aumento intracelular de ERO inducido por t-BHP	50
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	Metanol	Linfocitos humanos	↓ Niveles de MDA	↑ Actividad de las enzimas SOD y GPx, y los niveles de GSH	51
Ácido estíctico	<i>Xanthoparmelia conspersa</i> (Ach.) Hale [extracto metanólico]	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valor ORAC: 2,3 μmol TE/mg	15
Ácido salazínico	<i>Xanthoparmelia cantschadalis</i> (Ach.) Hale [extracto metanólico]	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valor ORAC: 2,7 μmol TE/mg	15
Ácido úsnico	<i>Xanthoparmelia conspersa</i> (Ach.) Hale <i>X. cantschadalis</i> (Ach.) Hale [extracto metanólico]	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valor ORAC: 2,9 μmol TE/mg	15
	Comercial	Línea celular SH-SY5Y modelo de neuronas humanas	↑ Lipoperoxidación	Buena capacidad antioxidante en ensayos de TRAP ( <i>total reactive antioxidant potential</i> ) y TAR ( <i>total antioxidant potential</i> ). ↓ Formación de OH <sup>·</sup> y NO Sin efecto en las actividades tipo CAT y SOD No protege frente a la muerte celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑ Producción de ERO intracelulares	52
<i>Xanthoparmelia cantschadalis</i> (Ach.) Hale y <i>X. conspersa</i> (Ach.) Hale	Metanol	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valores ORAC: 4,9 y 8,8 μmol TE/mg	
<i>Xanthoria elegans</i> (Link) Th. Fr.	Extracto acuoso	Linfocitos humanos	No estudiado	↑ TAC ( <i>total antioxidant capacity</i> ) sin modificar el nivel de TOS ( <i>total oxidant status</i> )	53

**Tabla 3.** Estudios *in vivo* que evalúan parámetros sobre propiedades antioxidantes de líquenes

Especie / Compuesto aislado	Solvente / Origen	Modelo de estudio	Inhibición de peroxidación lipídica	Enzimas antioxidantes y otros marcadores de actividad antioxidante	Referencia
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	-	Ratas Wistar (muestra: sangre)	↓ Niveles de MDA	↑ Niveles de GSG ↓ Actividades de CAT y GPx Su asociación con magnesio aumenta el efecto antioxidante	54
	<i>Usnea longissima</i> Ach.	Ratas Wistar		↑ Actividades de SOD y GPx, y los niveles de GSH	
Ácido difractaico	[extracto en dietiléter]	(muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación en tejidos	↓ Actividades de CAT y MPx ↑ Actividad de cNOS y ↓ actividad de iNOS	55
Ácido fumarprotocetrárico	<i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. [extracto acetónico]	Ratones Swiss Webster (muestra: tráquea y pulmones)	↓ Peroxidación lipídica inducida por endotoxina	No estudiado	56
<i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm.	Metanol	Ratas Wistar (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación en tejidos	↑ Actividades de SOD y GPx, y los niveles de GSH en tejidos Sin efecto en los niveles de CAT y MPx	57
<i>Peltigera rufescens</i> (Weiss) Humb.	Metanol	Ratas Sprague-Dawley (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación	Niveles de SOD, CAT, GSH, GR y GPx ↓ Actividades de MPx y iNOS	58
<i>Usnea ghattensis</i> G. Awasthi	Metanol	Ratones Swiss Webster (muestra: tejido hepático)	↓ Formación de MDA en tejido hepático	Depleción de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) y de GSH	26
<i>Usnea longissima</i> Ach.	Extracto acuoso	Ratas Wistar (muestra: tejido estomacal)	47,1% inhibición	↑ Niveles de SOD y GST ↓ Actividad CAT Poder reductor ( $A_{700}$ ): 0,1 Contenido fenólico: 18,3 mg ácido gálico / g	59
Ácido úsnico	[extracto en dietiléter]	<i>Usnea longissima</i> Ach. (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación en tejidos	↑ Niveles de SOD, GSH y GPx ↓ Actividades de CAT, GR y MPx ↑ Actividad de cNOS y ↓ actividad de iNOS	60

bioactivos a partir de los líquenes con actividades antioxidantes, por lo que se han realizado muchos ensayos de actividad antioxidante a partir de extractos metanólicos (20, 7).

Además de todas las especies y ensayos que se muestran en las tablas, algunos autores han medido parámetros similares por otros métodos, como por ejemplo otras propiedades de captación de radicales y también diferentes parámetros relacionados con el

potencial antioxidante de los líquenes y compuestos antes mencionados. Con respecto a otras propiedades de captación de radicales, (21) evaluaron la actividad captadora de radicales hidroxilo de los metabolitos de  $\beta$ -orcinol del líquen *Hypotrachyna revoluta* (Flörke) Hale (Parmeliaceae). La actividad de captación de radicales también se ha medido en *Toninia candida* (Weber) Th.Fr. (Ramalinaceae) (22), *Usnea ghattensis* G. Awasthi (Parmeliaceae) (23), y *Umbili-*



*cylindrica* (L.) Delise ex Duby (Umbilicariaceae) (24). La actividad de captación de radicales de óxido nítrico se analizó en *Usnea complanata* (Müll. Arg.), *Motyka* (Parmeliaceae) (25), *Usnea ghattensis* (26), ácidos psorómico y úsnico (25), y en otros 14 metabolitos purificados por líquenes (27). Además, se estudió la capacidad para eliminar el peróxido de hidrógeno en *Parmelia saxatilis* (28) y la capacidad antioxidante equivalente de Trolox se ha determinado mediante el ensayo de radicales ABTS en varias especies de líquenes polares (29), así como en *Usnea ghattensis* (23), *Laurera benguelensis* Zahlbr. (Zahlbr.).

Behera et al. (30, 31) evaluaron la capacidad inhibidora de la xantin oxidasa en especies de la familia Graphidaceae; la actividad quelante de iones hierro se ha investigado en *Umbilicaria cylindrica* (24) y *Toninia candida* (22), mientras que la actividad inhibidora de tirosin kinasa ha sido estudiada en algunos líquenes y compuestos aislados (32, 33).

Finalmente, es destacable el trabajo realizado por Lopes et al. (34), en el que se ensayaron las propiedades captadoras de radicales de numerosos derivados semisintéticos del ácido lecanórico obtenido de un espécimen de *Parmotrema tinctorum* (Delise ex Nyl.) Hale (Parmeliaceae). Se obtuvieron tres compuestos activos en la eliminación del radical DPPH, el ácido orselínico, el orcinol y el resorcinol, mientras que el orsellinato de metilo mostró la actividad más baja.

#### 4. CONCLUSIONES

Los estudios de las actividades antioxidantes de líquenes son de inicio muy reciente. Los ensayos *in vitro* realizados como primera aproximación han mostrado resultados muy interesantes en muchas de las especies estudiadas. Se recogen también en esta revisión los datos disponibles sobre las actividades antioxidantes *in vitro* de algunas especies de líquenes y de metabolitos aislados en sustratos celulares e *in vivo* en modelos animales.

Un mayor conocimiento de este potencial implica una investigación más profunda sobre sus actividades para comprender los mecanismos implicados. En relación con las propiedades antioxidantes, los compuestos más interesantes son los polifenoles. Las propiedades antioxidantes de los polifenoles se deben a la presencia de sus muchos grupos hidroxilo fenólicos, que les confieren una alta capacidad para captar radicales libres (35, 36). Por ejemplo, los compuestos fenólicos pueden donar hidrógeno a los radicales reactivos e inhibir la cadena de las reacciones de oxidación de los lípidos desde su inicio (37).

Así pues, la importante actividad antioxidante mostrada por algunos extractos de líquenes o sus metabolitos aislados, evaluada por diferentes métodos, se puede atribuir a su alto contenido

en polifenoles totales (especialmente representados por depsidos, depsidonas y dibenzofuranos, entre otros), habiéndose demostrado una correlación positiva entre la composición fenólica y la capacidad antioxidante para la mayoría de ellos (20, 24); ello sugiere que los constituyentes polifenólicos podrían ser los principales responsables de la actividad antioxidante observada en los líquenes estudiados. No obstante, es necesario destacar que existen otros estudios en los que los resultados no mostraron ninguna correlación positiva entre la actividad antioxidante de algunos líquenes y el contenido fenólico total (38,39). Este hecho implica que no deben ignorarse otros compuestos minoritarios, no fenólicos, presentes en los extractos liquénicos y que la actividad antioxidante también podría atribuirse a la presencia de estos compuestos no fenólicos, a interacciones antagónicas o sinérgicas entre los diversos constituyentes e incluso a las distintas actividades antioxidantes de compuestos fenólicos individuales (40,41).

Como hemos comentado, existe una gran diversidad de líquenes con composiciones químicas más o menos complejas, de forma que el creciente interés por el estudio de sus propiedades farmacológicas está impulsando más estudios filogenéticos en un contexto evolutivo. Basados principalmente en datos moleculares, están conduciendo a una clasificación más compleja de familias y especies de líquenes (42, 43). Además, el análisis filogenético de genes biosintéticos puede facilitar el descubrimiento de nuevos compuestos, nuevos genes y, por lo tanto, productores desconocidos de compuestos con actividad farmacológica relevantes, incluidos los antioxidantes: uno de los mayores desafíos lo constituye el encontrar el gen biosintético de interés en la biosíntesis de los metabolitos activos o asignar una función a cada uno de los genes biosintéticos que se encuentran en el genoma de un líquen (44). Teniendo en cuenta las dificultades que se siguen encontrando para el cultivo *in vitro* de líquenes debido a la producción de diferentes cantidades y tipos de metabolitos secundarios en función de las características del cultivo (45), el abordaje de un enfoque global de las características metabólicas de los líquenes es crucial para el desarrollo de procesos biotecnológicos novedosos y viables que permitan la producción de cantidades adecuadas de compuestos antioxidantes únicos aislados de líquenes (46).

Podemos concluir, por tanto, que los líquenes son una fuente potencial de antioxidantes naturales siendo aún necesarias investigaciones más profundas para establecer sus posibilidades y la mejor comprensión de sus mecanismos de acción. Este objetivo se puede lograr mediante el aislamiento y caracterización de los metabolitos purificados y posteriores estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que nos permitan identificar objetivos moleculares, compuestos activos y establecer las correlaciones estructura-actividad, todo ello con el objetivo final de su empleo en terapéutica.



## 5. REFERENCIAS

- Hawksworth DL, Honegger R. (1994). The lichen thallus: A symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. In: Williams MAJ, ed. Plant Galls. Special vol. 49. Oxford: The Systematics Association, 77–98.
- Illana-Esteban C. Lichens used in traditional medicine. Bol. Soc. Micol. Madrid. 2012; 36: 163-174.
- Gómez-Serranillos MP, Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Divakar PK, Crespo A. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. RSC Adv. 2014; 4: 59017-59047.
- Sánchez M, Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. The Genus *Cetraria* s. str.-A Review of Its Botany, Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacology. Molecules. 2022; 27(15):4990.
- Wang JY, Yang JY, Wang F, et al. Neuroprotective effect of pseudoginsenoside-f11 on a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;152798.
- Boustie J, Grube M. Lichens: A promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genet Resour. 2005; 3:273–87.
- Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. Pharm Biol. 2012; 50:778–98.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J Neurochem. 2006; 97(6):1634-58.
- Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. Adv Enzyme Regul. 1985; 23:217-37.
- Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. Z Naturforsch 2010; 65c:157–73.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. Chem Res Toxicol 2008; 21:172–88.
- Grice HC. Enhanced tumour development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. Food Chem Toxicol. 1986; 24:1127–30.
- Wichi, HP. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. Food Chem Toxicol. 1988; 26:717–23.
- Sundararajan R, Ahamad NH, Venkatesan K, et al. *Cytisus scoparius* link — A natural antioxidant. BMC Complement Altern Med. 2006; 6:8.
- de Paz G, Raggio J, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, et al. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. J Pharm Biomed Anal. 2010; 53:165–71.
- Jayaprakasha GK, Rao LJ. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stipiteum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. Z Naturforsch. 2000; 55:1018–22.
- Luo H, Li C, Kim JC, Liu Y, Jung JS, Koh YJ, Hur JS. Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilenta*. J Microbiol Biotechnol. 2013; 23(2):161-6.
- Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten Parmeliaceae Lichen Species. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 2016:3169751.
- Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. Food Chem Toxicol. 2017; 105:262-277.
- Kosanić M, Ranković B, Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species. J Food Sci Technol. 2011; 48:584–90.
- Papadopoulou P, Tzakou O, Vagias C, et al.  $\beta$ -Orcinol metabolites from the lichen *Hypotrachyna revolute*. Molecules. 2007; 12:997–1005.
- Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. Rev Bras Farmacogn. 2012; 22:291–8.
- Verma N, Behera BC, Makhija U. Antioxidant and hepatoprotective activity of a lichen *Usnea ghattensis* in vitro. Appl Biochem Biotechnol. 2008; 151:167–81.
- Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, et al. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). Evid Based Complement Alternat Med. 2012; 2012:452431.
- Behera BC, Mahadik N, Morey M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. Pharm Biol. 2012; 50:968–79.
- Verma N, Behera BC, Sonone A, Makhija U. Lipid peroxidation and tyrosinase inhibition by lichen symbionts grown in vitro. African J Biochem Res. 2008; 2:225–31.
- Thadhani VM, Choudhary MI, Ali S, et al. Antioxidant activity of some lichen metabolites. Nat Prod Res. 2011; 25:1827–37.
- Özen T, Kinalioglu K. Determination of antioxidant activity of various extracts of *Parmelia saxatilis*. Biologia. 2008; 63:211–16.
- Singh SM, Singh P, Ravindra R. Screening of antioxidant potential of Arctic lichens. Polar Biol. 2011; 34:1775–82.
- Behera BC, Adawadkar B, Makhija U. Inhibitory activity of xanthine oxidase and superoxide-scavenging activity in some taxa of the lichen family Graphidaceae. Phytomedicine. 2003; 10:536–43.



31. Behera BC, Adawadkar B, Makhija U. Tissue-culture of selected species of the Graphis lichen and their biological activities. *Fitoterapia*. 2006; 77:208–15.
32. Behera BC, Adawadkar B, Makhija U. Tyrosinase-inhibitory activity in some species of the lichen family Graphidaceae. *J Herb Pharmacother*. 2006; 6:55–69.
33. Paudel B, Bhattarai HD, Koh HY, et al. Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Phytomedicine*. 2011; 18:1285–90.
34. Lopes TI, Coelho R, Yoshida N, Honda NK. Radical-scavenging activity of Orsellinales. *Chem Pharm Bull*. 2008; 56:1551–4.
35. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15:7313–52.
36. Sawa T, Nakao M, Akaike T, et al. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J Agric Food Chem*. 1999; 47:397–402.
37. Gülçin I, Beydemir S, Alici HA, et al. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacol Res*. 2004; 49:59–66.
38. Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, et al. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytother Res*. 2004; 18:938–41.
39. Stojanović G, Stojanović I, Stankov-Jovanović V, et al. Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species. *Cent Eur J Biol*. 2010; 5:808–13.
40. Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. *Phytomedicine*. 2015; 22(9):847–55.
41. Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Provide Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2022; 27(19):6520.
42. Crespo A, Kauff F, Divakar PK, et al. Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon*. 2010; 59:1735–53.
43. Aoussar N, Laasri FE, Bourhia M, Manoljovic N, Mhand RA, Rhallabi N, Ullah R, Shahat AA, Noman OM, Nasr FA, Almarfadi OM, El Mzibri M, Vasiljević P, Benbacer L, Mellouki F. Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020; 2020:8104538.
44. Schmitt I, Barker FK. Phylogenetic methods in natural product research. *Nat Prod Rep*. 2009; 26:1585–602.
45. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghatten-sis*. *Phytother Res*. 2005; 19:58–64.
46. Letwin L, Malek L, Suntres Z, Christopher L. Cytotoxic and Antibiotic Potential of Secondary Metabolites from the Lichen *Umbilicaria muhlenbergii*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2020; 21(14):1516–1527.
47. Adenubi OT, Famuyide IM, McGaw LJ, Eloff JN. Lichens: An update on their ethnopharmacological uses and potential as sources of drug leads. *J Ethnopharmacol*. 2022; 298:115657.
48. Melo MG, dos Santos JP, Serafini MR, Caregnato FF, Pasquali MA, Rabelo TK, da Rocha RF, Quintans L Jr, Araújo AA, da Silva FA, Moreira JC, Gelain DP. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol In Vitro*. 2011; 25(2):462–8.
49. Kotan E, Alpsoy L, Anar M, Aslan A, Agar G. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB<sub>1</sub> in human lymphocytes in vitro. *Toxicol Ind Health*. 2011; 27(7):599–605.
50. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytother Res*. 2013; 27(3):431–7.
51. Alpsoy L, Orhan F, Nardemir G, et al. Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicol Ind Health* 2015; 31:153–61.
52. Rabelo TK, Zeidán-Chuliá F, Vasques L, et al. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicol In Vitro*. 2012; 26:304–14.
53. Turkez H, Aydin E, Aslan A. *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology*. 2011; 64:679–86.
54. Cernescu I, Tarțău L, Macavei A, Lupuşoru CE. Cercetări experimentale privind efectele unui extract din *Cetraria islandica* asupra stresului oxidativ la animale de laborator [Experimental research on the effects of a *Cetraria islandica* extract on oxidative stress in laboratory animals]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011; 115(3):899–904.
55. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*. 2006; 13(8):584–90.
56. de Barros Alves GM, de Sousa Maia MB, de Souza Franco E, Galvão AM, da Silva TG, Gomes RM, Martins MB, da Silva Falcão EP, de Castro CM, da Silva NH. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014; 27(2):139–43.



57. Karakus B, Odabasoglu F, Cakir A, Halici Z, Bayir Y, Halici M, Aslan A, Suleyman H. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. *Phytother Res.* 2009; 23(5):635-9.
58. Tanas S, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aygun H, Aslan A, Suleyman H. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *J Nat Med.* 2010; 64(1):42-9.
59. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phyto-medicine.* 2005; 12(9):656-62.
60. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006; 103(1):59-65.

Si desea citar nuestro artículo:

**Actividad antioxidante de especies líquénicas**

M. Pilar Gómez-Serranillos Cudrado

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 489-499

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.16>



## TERPENOS: UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS MEDIADAS POR EL INFLAMASOMA NLRP3

### A NEW THERAPEUTIC STRATEGY IN NLRP3 INFLAMMASOME - MEDIATED INFLAMMATORY DISEASES

**Beatriz de las Heras Polo**

Académica correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

**corresponding author:** lasherash@ucm.es

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

La inflamación se ha identificado como un componente crítico de numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Evidencias científicas recientes sugieren que el complejo multiproteico conocido como inflammasoma NLRP3 constituye una diana prometedora en el control de la inflamación. La activación del inflammasoma NLRP3 culmina con la activación de caspasa-1, que a su vez procesa y activa la producción de interleuquinas (IL-1 $\beta$ , IL-18) y de un tipo de muerte celular denominada piroptosis. La disregulación del inflammasoma NLRP3 ha sido implicada en la patogénesis, desarrollo y progresión de numerosas enfermedades inflamatorias humanas, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, neurológicas y metabólicas. Sin embargo, hasta el momento no se dispone de inhibidores del inflammasoma NLRP3 de uso clínico. Numerosos estudios indican el potencial de los productos naturales y, en particular de los terpenos en la modulación de esta vía en varios modelos preclínicos. En este contexto, los terpenos representan una aproximación terapéutica interesante en la búsqueda de nuevos tratamientos de enfermedades inflamatorias, al ejercer sus efectos antiinflamatorios a través de un mecanismo dual, que implicaría tanto la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, como la activación del inflammasoma. En este artículo se presenta una revisión del estado actual del potencial terapéutico de terpenos como inhibidores del inflammasoma NLRP3.

#### ABSTRACT

*Inflammation has been identified as a critical component of numerous inflammatory and autoimmune diseases. Recent scientific evidence suggests that the multiprotein complex known as the NLRP3 inflammasome is a promising target in the control of inflammation. Activation of the NLRP3 inflammasome culminates in the activation of caspase-1, which in turn processes and activates the production of interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-18) and a type of cell death called pyroptosis. Dysregulation of the NLRP3 inflammasome has been implicated in the pathogenesis, development and progression of numerous human inflammatory diseases, including cardiovascular, neurological and metabolic diseases. However, no NLRP3 inflammasome inhibitors for clinical use are currently available. Numerous studies indicate the potential of natural products and, in particular, terpenes in modulating this pathway in several preclinical models. In this context, terpenes represent an interesting therapeutic approach in the search for new treatments of inflammatory diseases, by exerting their anti-inflammatory effects through a dual mechanism, which would involve both the inhibition of the transcription factor NF- $\kappa$ B, as the activation of the inflammasome. This article presents a review of the current state of the therapeutic potential of terpenes as inhibitors of the NLRP3 inflammasome.*

#### Palabras Clave:

terpenos  
inflamación  
inflammasoma  
NLRP3

#### Keywords:

terpenes  
inflammation  
NLRP3  
inflammasome





## 1. INTRODUCCIÓN

La respuesta inflamatoria es uno de los principales mecanismos efectores del sistema inmune innato frente a situaciones de peligro del organismo como las infecciones microbianas o el daño tisular. La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa y se desencadena tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que conducen al reclutamiento de células inflamatorias y a la liberación de mediadores proinflamatorios. Los PAMPs se encuentran en microorganismos como el lipopolisacárido (LPS) de las membranas de bacterias Gram-negativas, ácidos nucleicos bacterianos o virales, péptidos bacterianos como flagelina, y polisacáridos como los  $\beta$ -glucanos. Los DAMPs son moléculas endógenas liberadas en situaciones de estrés o daño, como las proteínas asociadas a la cromatina, proteínas de choque térmico, cristales de uratos, adenosina trifosfato extracelular (ATP), especies reactivas de oxígeno (ROS) y fragmentos de la matriz extracelular (1).

Los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), localizados en la membrana celular o en el espacio intracelular, son responsables del reconocimiento de estímulos proinflamatorios. Se han identificado distintas familias de PRRs, entre ellas las que reconocen patógenos, que incluyen los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos, NLRs), receptores RIG-1 (proteína inducible por ácido retinoico), receptores tipo lectina C (CLRs), receptores tipo AIM2 (o ausentes en melanoma, ALRs) y pirina, entre otros (2, 3). La unión de los PAMPs y DAMPs a los PRRs conduce a la activación de múltiples vías de señalización que promueven la expresión de varias citoquinas, como es la vía del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, factores reguladores del interferón (IRF) o la formación del inflamasoma (2).

Entre los PRRs, los receptores NLRs y ALRs pueden formar complejos multiproteicos denominados inflamasomas, con un papel destacado en la respuesta inmune innata, iniciando una respuesta de defensa frente a patógenos y células dañadas. La desregulación de esta respuesta puede originar una inflamación crónica que contribuye al desarrollo de diversas patologías. Estudios recientes sugieren que la familia NLR y los complejos del inflamasoma están implicados en el desarrollo y progresión de varias enfermedades inflamatorias, por lo que constituyen una nueva diana terapéutica de gran interés en la búsqueda de nuevos tratamientos (3, 4).

## 2. INFLAMASOMA Y MECANISMOS DE ACTIVACIÓN

El concepto de inflamasoma, (complejo proteico con un peso molecular aparente  $> 700$  kDa) fue propuesto inicialmente por Tschopp en 2002 (5). En las últimas dos décadas, se ha avanzado

en el conocimiento de los distintos tipos de inflamasomas, definiendo sus componentes, así como los mecanismos moleculares responsables de su activación y regulación (6).

Los inflamasomas contienen en su estructura tres componentes esenciales para su activación:

- Una proteína sensora: (un NLR, como NLRP1, NLRP3 y NLRC4 o un ALR como AIM2), capaz de reconocer tanto PAMPs como DAMPs.
- Una proteína adaptadora denominada proteína asociada a la apoptosis (*Apoptotic-Associated Speck-like Protein*, ASC) que actúa como puente de unión entre NLRs/AIM2, y
- Una molécula efectora, la pro-caspasa-1 que actúa como precursora de caspasa-1.

En función de la proteína sensora que estimula su ensamblaje, se pueden clasificar en inflamasomas que contienen dominios de oligomerización unidos a nucleótidos (NOD-NATCH) y dominios ricos en leucina (NLRs), y en inflamasomas que carecen de estos dominios (no-NLRs) (7).

En concreto, los receptores tipo NOD (NLRs) son una familia de receptores intracelulares que se clasifican en base a su homología estructural compartida de 3 dominios funcionales: un dominio amino terminal que contiene los dominios de reclutamiento de caspasa "C" (CARD) o de pirina (PYD); un dominio central NATCH responsable de la oligomerización, presente en todas las proteínas NLR, y un dominio carboxi terminal rico en repeticiones de leucina (LRR) que se une al ligando (8). Los inflamasomas más conocidos dentro de esta familia reciben los nombres de NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP12 y NLRC4.

Algunos miembros de esta familia de receptores como NLRP1, NLRP3 y NLRC4 intervienen en la formación de los inflamasomas denominados canónicos al activar directamente caspasa-1 (9).

Adicionalmente, los No-NLRs incluyen los inflamasomas AIM2 y Pirina. AIM2 es un receptor ALR capaz de reconocer ADN patógeno citosólico y nuclear. Los miembros de esta familia incluyen AIM2 y la proteína 16 inducible de interferón gamma (IFI16) que actúan como sensores de ADN activando el inflamasoma. Contienen un dominio N-terminal de pirina (PYD) y otro dominio formado por una proteína nuclear inducible por interferón con unión C-terminal al DNA con un dominio de repeticiones de 200 aminoácidos (HIN200).

La activación de NLR/AIM2 por PAMPs and DAMPs inicia el reclutamiento de la proteína adaptadora ASC al complejo por interacción con el dominio pirina, formando una estructura supra-molecular denominada piroptosoma. La proteína ASC desempeña un papel crítico en el ensamblaje del inflamasoma, ya que para su



formación completa, requiere la unión de la pro-caspasa-1 a la proteína ASC a través de la interacción de los dominios CARD-CARD (10). La formación del inflamasoma resulta en la activación autocatalítica de la pro-caspasa-1 para formar enzimáticamente la caspasa-1, que procesa y activa la maduración de las formas precursoras pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 a las formas bioactivas IL-1 $\beta$  y IL-18. Estas citoquinas proinflamatorias promueven la activación de NF- $\kappa$ B a través de los receptores transmembrana IL-1R e IL-18r induciendo la inflamación (11). La mayoría de los inflasomas utilizan ASC para iniciar su ensamblaje, pero en algunos casos particulares, la pro-caspasa-1 puede ser reclutada directamente interactuando con los NLRs a través del dominio CARD (5).

Además, un sustrato directo y esencial de caspasa-1 es la proteína gasdermina D (GSDMD). La caspasa-1 hidroliza el fragmento N-terminal de gasdermina (GSDMD-NT) formando poros en la membrana plasmática, y originando un tipo de muerte celular necrótica programada denominada piroptosis. La piroptosis incluye también la liberación de contenido intracelular, como los oligómeros del inflamasoma y el ADN mitocondrial, factores que contribuyen a la respuesta inflamatoria (12).

Por todo ello, los inflasomas desempeñan un papel destacado en la patogénesis y progresión de numerosas enfermedades inflamatorias, constituyendo en la actualidad una diana prometedora para el desarrollo de nuevas terapias (4, 9, 13). Los inflasomas más estudiados han sido:

- **NLRP1**, primer inflamasoma identificado, actúa como sensor de la toxina letal del *Bacillus anthracis*, responsable del proceso infeccioso conocido como carbunco o ántrax, o de la infección por *Toxoplasma gondii*. Se trata del único inflamasoma cuya proteína receptora contiene dos dominios de muerte: un dominio PYD N-terminal y un dominio CARD C-terminal. Debido a ello, se ha descrito la activación de caspasa-1 en ausencia de ASC por interacción directa entre los dominios CARD de NLRP1 y la procaspasa-18 (14).
- **NLRP3** es el inflamasoma mejor caracterizado hasta el momento. A diferencia de otros, es el único inflamasoma que se activa por estímulos de diversa naturaleza, habiéndose descrito su implicación en numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La importancia de NLRP3 como regulador de la homeostasis inmune ha quedado evidenciada por el hecho de que mutaciones en el gen *NLRP3* causan enfermedades autoinmunes como el síndrome de Muckle-Wells y el síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío (FCAS) (15).
- **NLR4** es un importante sensor para la formación del inflamasoma tras el reconocimiento de proteínas bacterianas, como flagelina o proteínas del sistema de secreción tipo III (T3SS). Entre los NLRs, NLR4 presenta características especiales al requerir

sensores adicionales, como la familia NLR de proteínas inhibidoras de apoptosis (NAIPs), que actúan como receptores citosólicos para flagelina y T3SS. Tras la unión al ligando, las NAIPs reclutan y co-oligomerizan con NLR4, activando la caspasa-1 (16).

- **AIM2**, inflamasoma no-NLR, es un sensor del ADN de virus y bacterias patógenas, incluyendo citomegalovirus, *Francisella tularensis* y virus vaccinia. A diferencia del inflamasoma NLR4, AIM2 no contiene dominios CARD, necesitando reclutar a ASC para su activación (17). AIM2 es un receptor citosólico perteneciente a la familia de proteínas PYHIN que contienen un dominio Pirina N-terminal (PYH) y un dominio C-terminal HIN200 que se une directamente al ADN del patógeno. Una vez sucede la oligomerización del receptor con la proteína adaptadora ASC, se produce la activación de la caspasa-1 (18).
- **Pirina** es un inflamasoma capaz de detectar las modificaciones covalentes de la familia de proteínas Rho inducidas por toxinas bacterianas, aunque no es un sensor directo de PAMPs. Contiene un dominio PYD N-terminal que interactúa con ASC induciendo la activación posterior de caspasa-1 con producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 (19).

### 3. VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL INFLASOMA NLRP3

La activación del inflamasoma NLRP3 ha sido descrita en varios tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, microglia, linfocitos, células epiteliales, osteoblastos, neuronas y células dendríticas, de ahí su relación con enfermedades inflamatorias en distintos órganos como piel, cerebro, corazón e hígado (9, 20, 21).

A semejanza de otros inflasomas, el complejo inflamasoma NLRP3 está formado por un sensor (proteína NLRP3), un adaptador (proteína ASC) y un efector (caspasa-1) (22). El inflamasoma NLRP3 humano comprende dominios PYD, NACHT y LRR. El dominio NACHT es fundamental para la asociación de NLRP3 determinando su función. Una vez activado, NLRP3 se une directamente a la proteína Ser/Thr quinasa NEK7, un co-activador de NLRP3 recientemente identificado, sufriendo una transición conformacional hidrolizando el ATP a ADP (23, 24). La hidrólisis del ATP estimula el ensamblaje y reclutamiento de la proteína adaptadora ASC y de pro-caspasa-1, con escisión posterior de caspasa-1 y activación de NLRP3.

El inflamasoma NLRP3 puede ser activado por un amplio espectro de estímulos, desde ATP extracelular y toxinas bacterianas formadoras de poros a micropartículas. Se han descrito tres vías principales que regulan su actuación interfiriendo con su ensamblaje, denominadas vía canónica, no canónica y, más recientemente, la vía alternativa.



En la **vía canónica**, la activación del inflammasoma NLRP3 se considera un proceso dirigido por dos señales, una señal "priming" preestimuladora a través de los receptores TLRs que regula la expresión de los componentes del inflammasoma, y una señal de activación. La primera señal estimula la expresión de pro-IL-1 $\beta$  y de NLRP3 a nivel transcripcional, principalmente a través de la regulación de la vía de señalización de TLRs-NF- $\kappa$ B. La primera señal o "priming" también controla las modificaciones post-transcripcionales de NLRP3 como ubiquitinación y fosforilación, que ejercen un papel regulador en la activación de NLRP3 (25).

La segunda señal es específica del inflammasoma, depende del flujo de ión K<sup>+</sup>, e inicia la formación y activación del complejo del inflammasoma. A diferencia de la mayoría de PRRs, NLRP3 puede ser activado por estímulos asociados tanto con PAMPs como DAMPs, entre los que se incluyen ATP extracelular, toxinas bacterianas formadoras de poros (nigericina), virus, hongos, protozoos, ROS producidos por disfunción mitocondrial, así como micropartículas como los cristales de monourato sódico (MSU), asbestos o sílica, lo que determina que NLRP3 sea el inflammasoma más versátil (25, 26).

Además, se ha descrito la **vía no canónica** dirigida por la caspasa-11. La activación de esta vía mediada por LPS citosólico también conduce al ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (27). El reconocimiento de caspasa-11 por el LPS intracelular, junto a la acción de proteínas de unión a interferón (Proteínas de unión a guanilato, GBPs) produce la polimerización de caspasa-11 y su activación autocatalítica. A diferencia de caspasa-1, la caspasa-11 activada no puede escindir pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, pero sí GSDMD para generar GSDMD-NT, con capacidad para formar poros en la membrana plasmática y, por tanto, mediando la salida de K<sup>+</sup>. Esta es la teoría aceptada en la actualidad para explicar la activación de NLRP3 por la vía no canónica.

Así mismo, se ha descrito una tercera vía denominada activación **alternativa** del inflammasoma NLRP3 que es independiente de la salida de K<sup>+</sup>, pero que se induce a través de la vía TLR4-RIPK1-FADD-caspasa 8 por estimulación con LPS en ciertas condiciones. FADD-caspasa-8 representa una vía extrínseca de apoptosis. Además, la activación de NLRP3 por la vía alternativa no causa muerte celular por piroptosis (28). La vía de señalización FADD-caspasa 8 facilita la activación del inflammasoma NLRP3 por aumento de la expresión de NLRP3 y de pro-IL-1 $\beta$  a nivel transcripcional a través de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B. De forma simultánea, FADD-caspasa 8 promueve la activación de pro-caspasa-1 directamente a través de su unión al inflammasoma NLRP3-ASC.

#### 4. EL INFLAMASOMA NLRP3 EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

Numerosos estudios han evaluado el papel que desempeña el inflammasoma en la inmunidad y como factor patológico en enfermedades crónicas (3, 9). La activación del inflammasoma NLRP3 desencadena procesos inflamatorios, que regulan la respuesta inmune. Sin embargo, una activación persistente y excesiva del inflammasoma NLRP3 está íntimamente ligada a la patogénesis de numerosas enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, metabólicas, neurológicas, enfermedades autoinmunes, cáncer, así como un grupo de enfermedades autoinflamatorias raras conocida como síndrome periódico asociado a criopirina, entre otras (4, 29).

Las mutaciones en el gen NLRP3 constituyen un factor etiológico de un grupo de enfermedades raras autoinflamatorias conocidas como síndrome periódico asociado a criopirina (CAPS), caracterizada por fiebre e inflamación sistémica recurrente. CAPS incluye tres fenotipos: Síndrome Autoinflamatorio Familiar inducido por Frío (FCAS), Síndrome de Muckle-Wells (MWS) y Enfermedad Autoinflamatoria Multisistémica de Inicio Neonatal / Síndrome Articular Cutáneo Neurológico Crónico Infantil / Síndrome Inflamatorio Crónico (CINCA/NOMID) (15).

Estas mutaciones en NLRP3 se traducen en una activación continua de caspasa-1 con hipersecreción de IL-1 $\beta$ , produciendo un estado de inflamación crónica. Por ello, se ha descrito un aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-18 en monocitos y macrófagos de pacientes con CAPS sin estímulo externo (30). Además de las células señaladas, NLRP3 puede activarse en otros tipos celulares relacionados con enfermedades inflamatorias en distintos órganos. Así, el inflammasoma NLRP3 ha sido implicado en enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y Parkinson o en el daño cerebral traumático (31, 32). A su vez está implicado en enfermedades metabólicas como gota, diabetes tipo 2, y obesidad por resistencia a la insulina; enfermedad hepática del hígado graso no alcohólico (33); enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis y otras patologías cardíacas (21, 34); y en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico (35-37). Por otra parte, evidencias científicas avalan la participación de NLRP3 en la patogénesis de la depresión (38).

La inflamación crónica inducida por los inflammasomas también puede afectar a todos los estadios del desarrollo de tumores, causando alteración del microambiente, neoangiogénesis, proliferación de células tumorales y metástasis, al ser las citoquinas proinflamatorias mediadores importantes de la tumorigénesis inducida por la inflamación (39, 40). Por el contrario, en cáncer de

colón se ha descrito un efecto supresor de la formación de tumores por el inflamasoma NLRP3. Por tanto, la activación del inflamasoma NLRP3 puede aumentar o inhibir la progresión del tumor y la metástasis dependiendo del tipo de tumor y del contexto en que se encuentra.

NLRP3 también está implicado en patologías de la piel como acné, dermatitis atópica, psoriasis y vitiligo (4). Estudios más recientes sobre la enfermedad por Coronavirus (COVID-19) apoyan la teoría de que el inflamasoma NLRP3 participa en el desarrollo de los síntomas respiratorios, cardiovasculares y neurológicos en pacientes con COVID-19 (41).

En conjunto, la inflamación mediada por la activación del inflamasoma NLRP3 está implicada en una amplia variedad de enfermedades, por lo que la modulación del estado de activación del inflamasoma puede ser beneficioso en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas con un claro componente inflamatorio.

## 5. TERPENOS

Los productos naturales y sus derivados representan una fuente destacada en el descubrimiento de moléculas bioactivas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. En particular, los terpenos constituyen una alternativa potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, al haber sido descritos tradicionalmente en la literatura como agentes antiinflamatorios. Hasta el momento, su mecanismo de acción se había asociado a la inhibición de vías de señalización clásicas, como la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en varios modelos experimentales de inflamación (42-45).

En los últimos años y dada la descripción del inflamasoma como una diana emergente en inflamación, numerosos estudios han evaluado la actividad de diterpenos y triterpenos como inhibidores de la activación canónica del inflamasoma NLRP3 (29, 46-49) (Figura 1, Tabla 1). De acuerdo con ello, esta revisión se ha centrado en examinar de forma crítica la literatura científica publicada sobre los terpenos más prometedores como potenciales inhibidores del inflamasoma NLRP3.

### Partenólido

Partenólido es una lactona sesquiterpénica aislada de la especie vegetal *Tanacetum parthenium* Sch. Bip. (Asteraceae), tradicionalmente utilizada por sus propiedades antiinflamatorias atribuidas a la inhibición de la vía de activación de NF- $\kappa$ B. Fue el primer producto natural descrito como inhibidor de la activación del inflamasoma NLRP3 por su acción directa sobre caspasa-1 (50). Este mecanismo ha sido relacionado con los efectos protectores mostrados por este compuesto en un modelo murino de resistencia a la insulina inducida por obesidad (51).

### Andrografólido

Andrografólido es un diterpeno aislado de *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (Acanthaceae), utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (52). Estudios recientes señalan la acción inhibidora de este diterpeno en la formación del inflamasoma NLRP3 como mecanismo responsable de los efectos antiinflamatorios mostrados en distintos modelos preclínicos de enfermedad de hígado graso no alcohólico, daño pulmonar, artritis reumatoide y colitis asociada a cáncer (53-55). En estos modelos, los efectos inhibitorios de andrografólido se han relacionado con la interrupción del ensamblaje NLRP3-caspasa-1, produciendo inhibición de la activación de caspasa-1 y, por tanto, disminución de la secreción de IL-1 $\beta$ . Además, se ha descrito que un derivado de este compuesto es capaz de reducir la esteatosis hepática, fibrosis y daño hepático, por sus propiedades antioxidantes relacionadas con la regulación del factor eritroide 2 (Nrf2) y antiinflamatorias al atenuar la activación de NLRP3, resultados corroborados en un modelo murino de esteatosis inducido por una dieta alta en grasas y colesterol (56). Mecanismos similares se encuentran implicados en los efectos protectores mostrados por este diterpeno y sus derivados en modelos animales de daño pulmonar inducido por distintos agentes como LPS, ovoalbúmina o partículas de sílica (57-59). Así mismo, ha mostrado actividad sobre la neuroinflamación presente en modelos de daño cerebral por hemorragia intracerebral y en enfermedad de Parkinson (60, 61).

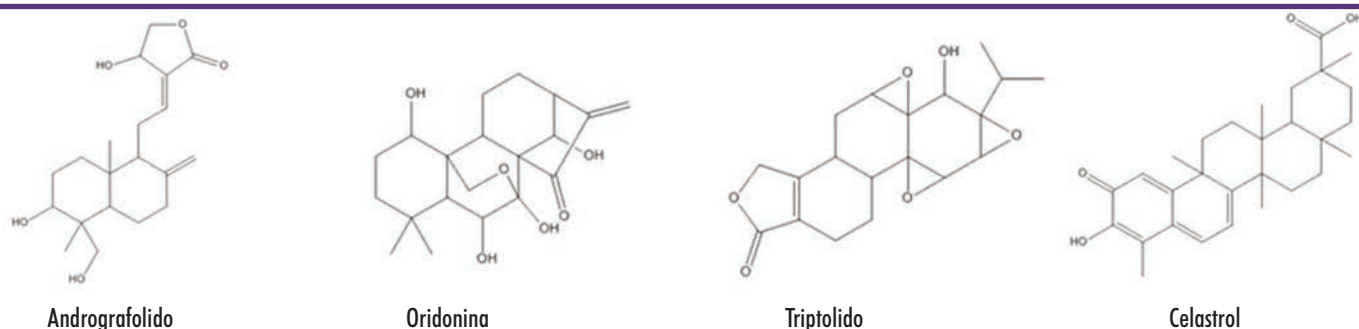


Figura 1. Estructuras químicas de terpenos inhibidores de la activación del inflamasoma NLRP3.





Terpenos	Mecanismo molecular	Modelos experimentales	Referencias
Andrografólido	Reducción de la expresión de los componentes del inflammasoma (ASC, caspasa-1, IL-1 $\beta$ ).	Colitis asociada a cáncer	(55)
		Esteatosis hepática no alcohólica	(54, 56)
		Daño pulmonar	(57-59)
		Daño cerebral	(60)
		Parkinson	(61)
Oridonina	Bloqueo de la interacción entre NLRP3 y NEK7. Inhibición de NF- $\kappa$ B. Inhibición de NLRP3/caspasa-1/Gasdermina.	Diabetes tipo 2	(63)
		Peritonitis y artritis gotosa inducida por cristales de urato	(63)
		Fibrosis hepática	(65)
		Pérdida de audición inducida por distintos agentes	(66, 67)
		Daño por isquemia/reperfusión Daño pulmonar agudo	(64, 68) (69)
Triptolido	Interrupción del ensamblaje NLRP3-ASC y supresión de la expresión de TLR4.	Fibrosis cardíaca	(70,72)
		Remodelado cardíaco	(71)
		Daño renal	(73)
Celastrol	Bloqueo de la oligomerización de ASC y formación del complejo NLRP3, autofagia, inhibición de NF- $\kappa$ B y de producción de ROS.	Shock séptico inducido por LPS	(74, 75)
		Colitis inducida por DSS	(74, 75)
		Artritis reumatoide y gotosa	(76, 78)
		Parkinson	(77)
		Daño hepático	(78)
		Daño medular	(79)

### Oridonina

Oridonina es un diterpeno *ent*-kaurano obtenido de la especie *Rabdosia rubescens*, (Hemsl.) Hara (Lamiaceae), ampliamente utilizado en la Medicina Tradicional China. Numerosos estudios han puesto de manifiesto las propiedades antiinflamatorias de este diterpeno atribuidas a la reducción de varios mediadores proinflamatorios por su efecto inhibitor a nivel de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, de su translocación nuclear y de su unión al ADN (62).

Un estudio más reciente ha caracterizado a oridonina como un inhibidor covalente selectivo e irreversible del inflammasoma NLRP3, al inhibir el ensamblaje y la activación de NLRP3, disminuyendo la producción de IL-1 $\beta$  (63). Desde el punto de vista mecanístico, oridonina es capaz de bloquear la interacción NLRP3-NEK7, indispensable para la activación de NLRP3, gracias a la presencia en su estructura de un grupo carbonilo  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado a través de adición de Michael y unión covalente al residuo de cisteína C279 en el dominio NATCH de la proteína NLRP3, un paso relevante para la posterior oligomerización y reclutamiento de ASC. Sin embargo, oridonina no actúa sobre la actividad ATPasa de NLRP3 o en el reclutamiento de ASC (63). Así mismo, se han descrito

efectos inhibidores dosis-dependientes de este diterpeno sobre la escisión de caspasa-1, secreción de IL-1 $\beta$ , y muerte celular tras la estimulación del inflammasoma con distintos agonistas de NLRP3. Adicionalmente, oridonina mostró efectos terapéuticos en modelos de enfermedades crónicas como peritonitis, artritis gotosa, diabetes tipo 2 y fibrosis hepática. Los efectos protectores de oridonina mostrados en la atenuación del daño por isquemia/reperfusión en extremidades se asocian con sus efectos antiinflamatorios relacionados con el inflammasoma NLRP3 (63-65).

Además, este compuesto era capaz de prevenir la pérdida de audición relacionada con la acumulación de ROS y de inflamación en modelos murinos. Así, se demostraron los efectos protectores de oridonina atribuidos a la inhibición de la vía de NLRP3/caspasa-1/gasdermina D, disminuyendo la muerte celular por piroptosis, cuando el agente inductor es un antibiótico aminoglucósido como la kanamicina o un bloqueo de la interacción NLRP3-NEK7, cuando existe pérdida de audición por ruido (66, 67).

Adicionalmente, oridonina ha mostrado efectos protectores en enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio al disminuir la fibrosis miocárdica y preservar la función cardíaca en modelos animales (68). Así mismo, este diterpeno podría ser



eficaz frente al daño pulmonar agudo al reducir la inflamación mediante la regulación de la expresión de componentes del inflamasoma NLRP3 e inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B, así como por sus propiedades antioxidantes dependientes de la inhibición de Nrf2 (69).

### Triptolido

Triptolido es el principio activo de la especie *Tripterygium wilfordii* Hook F (Celastraceae), ampliamente utilizada en la Medicina Tradicional China. Los efectos antifibróticos de este diterpeno han sido descritos en un modelo murino de fibrosis cardiaca por reducción de la inflamación cardiaca (70). El estudio de los mecanismos moleculares implicados indica que la inhibición de la activación del inflamasoma NLRP3 se produce por un mecanismo dual, al regular la expresión de los componentes del inflamasoma como NLRP3 y ASC, a la vez que bloquea el ensamblaje ASC-NLRP3. Triptolido mostró efectos beneficiosos sobre la remodelación cardiaca mejorando la función cardiaca y la hipertrofia ventricular, al disminuir la inflamación por su acción inhibitoria de NLRP3 en corazones expuestos a una sobrecarga de presión de forma crónica (71). En un modelo de fibrosis cardiaca en ratas se ha descrito que la inhibición de la activación de NLRP3 que ejerce este diterpeno se asocia

a su efecto inhibitorio de la vía de NF- $\kappa$ B (72). De forma semejante, se ha observado que actúa como regulador de la expresión de NLRP3 y de TLR4 con mejoría significativa de parámetros de función renal en un modelo de daño renal en ratas tratadas con triptolido, con reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias (73).

### Celastrol

El triterpeno celastrol es un compuesto bioactivo aislado también de *Tripterygium wilfordii* Hook F. (Celastraceae) con propiedades antiinflamatorias atribuidas a la inhibición de la activación del inflamasoma NLRP3, demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Resultados obtenidos en modelos animales han puesto de manifiesto los efectos protectores de celastrol en modelos de shock séptico inducido por LPS y colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) (74, 75). Los mecanismos implicados incluyen el bloqueo de la oligomerización de ASC y la activación de autofagia, que conducen a la inhibición de la activación de caspasa-1 y disminución de la liberación de citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18, bloqueando la activación del inflamasoma NLRP3. Se ha descrito además, que celastrol es capaz de inhibir la activación del inflamasoma y la escisión de caspasa-1 inducida por LPS/ATP, así como la vía de NF- $\kappa$ B y la producción de ROS, comportándose como un inhibidor dual en la

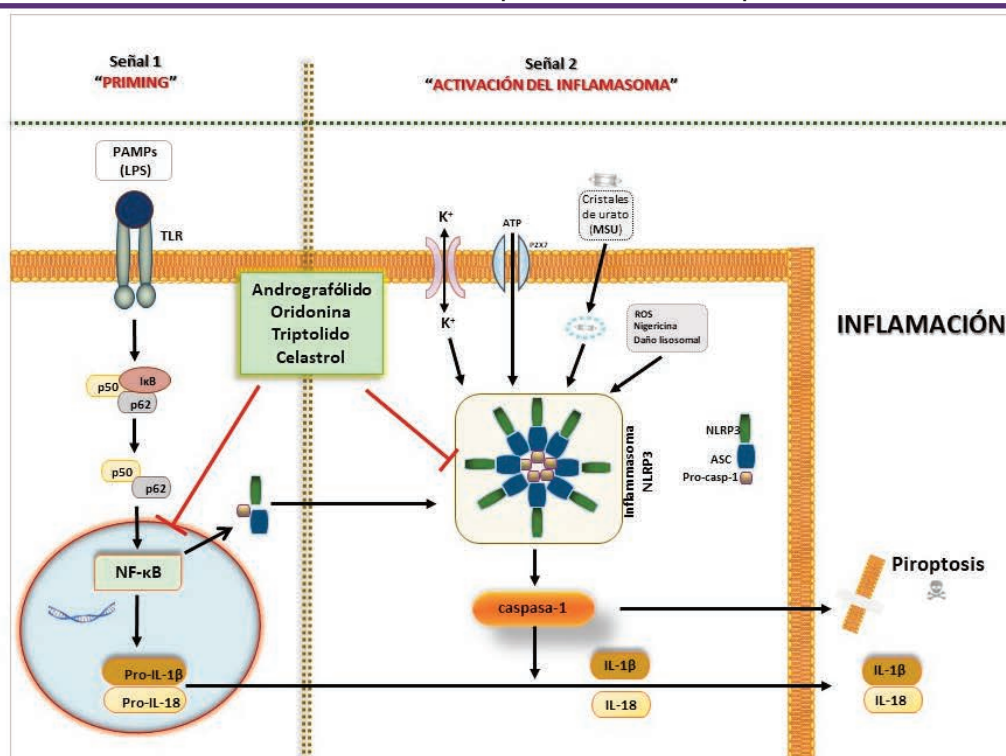


Figura. 2. Vías de señalización implicadas en la regulación del inflamasoma NLRP3 por terpenos. En la activación canónica del inflamasoma se requieren dos señales: señal 1 o "priming" donde los TLRs reconocen a los PAMPs como el lipopolisacárido LPS induciendo la activación de NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo, produciendo la transcripción de pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 y de los componentes del inflamasoma; la señal 2 o activación, está inducida por diversos estímulos (ATP, Nigericina, ROS). La activación de caspasa-1 induce la maduración y liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18, produciendo el ensamblaje y oligomerización del complejo del inflamasoma NLRP3. Los diterpenos y triterpenos señalados son potentes inhibidores del inflamasoma NLRP3, actuando en distintas etapas de las vías implicadas en la activación del mismo.



vía de activación del inflamasoma al inhibir tanto el “priming” como la activación. Estos mecanismos son responsables del efecto protector mostrado por este compuesto en modelos animales de artritis reumatoide en ratas y de Parkinson en ratones (76, 77). Así mismo, ha mostrado efecto protector en artritis gotosa inducida por cristales de urato en ratones por un mecanismo relacionado con la inhibición de la ubiquitinación de K63 en NLRP3, suprimiendo así la activación de este inflamasoma (78). Celastrol también mostró actividad antiinflamatoria y neuroprotectora en un modelo de daño medular en ratas al reducir la activación de la microglia por inhibición de la vía del inflamasoma NLRP3, así como la expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular por piroptosis (NLRP3, ASC, Caspasa-1 y GSDMD) con disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18) (79).

### Otros terpenos

Artesunato, un derivado de la lactona sesquiterpenica artemisinina obtenida de la especie *Artemisia annua* L. (Asteraceae), redujo significativamente la neuroinflamación en un modelo de lesión cerebral traumática, por sus efectos inhibitorios en la activación de NF- $\kappa$ B, en la liberación de citoquinas proinflamatorias y en la activación del inflamasoma NLRP3 (80). Los efectos protectores de este compuesto fueron también descritos en un modelo murino de distress respiratorio agudo (81).

Dehidrohispanolona es un diterpeno labdánico aislado de las partes aéreas de especies del género *Ballota* (Lamiaceae). Este diterpeno, así como algunos derivados han mostrado efectos antiinflamatorios en vías inflamatorias clásicas (43, 44). Las propiedades antiinflamatorias de algunos análogos han sido atribuidas recientemente a su actuación sobre la diana del inflamasoma NLRP3. Así, derivados oxima de dehidrohispanolona han sido descritos como inhibidores selectivos de NLRP3 (82).

Más recientemente se ha descrito que el diterpeno dehidroisohispanolona es capaz de inhibir la activación de caspasa-1 y la posterior secreción de IL-1 $\beta$  mediante la inhibición del inflamasoma NLRP3 en macrófagos. Estudios de Docking molecular confirmaron que este diterpeno adoptaba una conformación favorable en el bolsillo ATP del inflamasoma NLRP3 mediante la formación de un enlace covalente con la cisteína 415, confirmandose, de este modo, la inhibición directa del inflamasoma NLRP3. Además, este compuesto ejerce su actividad antiinflamatoria actuando como un inhibidor dual tanto de la activación de NF- $\kappa$ B como de NLRP3, disminuyendo también la piroptosis (83).

El triterpeno betulina, abundante en varias especies del género *Betula* (Betulaceae) también es capaz de reducir la inflamación hepática en ratas inducida por cisplatino por un mecanismo relacionado con la inhibición del inflamasoma NLRP3 por su acción sobre caspasa-1, reduciendo los niveles de IL-1 $\beta$  (84).

En conjunto, los resultados mostrados identifican al inflamasoma NLRP3 como una diana molecular implicada en el mecanismo de acción de estos terpenos. Este hecho reafirma el papel de los productos naturales como agentes terapéuticos prometedores en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias. Además, los efectos inhibitorios de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B atribuidos a los compuestos terpénicos permiten abrir nuevas estrategias para desarrollar moléculas que sean inhibidores duales y que puedan, simultáneamente, suprimir la activación del inflamasoma y la activación dependiente de NF- $\kappa$ B (Figura 2).

## 6. CONCLUSIONES

La búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios sigue siendo un área de investigación relevante debido a la complejidad del proceso inflamatorio, así como por la implicación de la inflamación en numerosas patologías.

Evidencias científicas recientes señalan al inflamasoma NLRP3 como un factor intrínseco destacado en el sistema inmune innato en respuesta a una amplia variedad de estímulos, ya que su desregulación se ha asociado con el desarrollo y progresión de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La activación de NLRP3 y la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-18) ha sido demostrada en enfermedades con componente inflamatorio. Por todo ello, el conocimiento del proceso que interviene en la activación y regulación del inflamasoma abre nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias antiinflamatorias constituyendo NLRP3, caspasa-1 e IL-1 $\beta$  nuevas dianas terapéuticas de gran interés. Hasta el momento, no se dispone de ningún inhibidor del inflamasoma NLRP3 de uso clínico.

Los terpenos son un grupo de productos naturales que presentan una gran diversidad estructural y biológica. Estudios recientes han revelado que son compuestos capaces de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 modulando la patogenicidad de la enfermedad inflamatoria. Los estudios resumidos señalan a los terpenos como agentes reguladores de NLRP3 mostrando efectos beneficiosos en varios modelos experimentales de enfermedades inflamatorias crónicas (colitis, artritis gotosa, daño pulmonar agudo...). Tradicionalmente, estos compuestos han sido identificado como potentes inhibidores del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, un factor regulador de la transcripción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias implicadas en distintas enfermedades inmunes e inflamatorias crónicas. A su vez, NF- $\kappa$ B es una señal activadora del inflamasoma, siendo responsable de la síntesis de sus componentes, por lo que la actuación sobre esta vía puede también resultar en una disminución de los niveles de IL-1 $\beta$ .

Aunque todavía no se conocen con exactitud los mecanismos exactos por los que los terpenos regulan la activación del complejo del inflamasoma, estudios recientes sugieren que estos compuestos representan una aproximación terapéutica en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios. Los efectos inhibitorios combinados de los terpenos, tanto a través de la vía TLR4-NF- $\kappa$ B, como en el proceso de activación del inflamasoma NLRP3, pueden posicionar a estos compuestos como candidatos prometedores en la búsqueda de terapias nuevas y efectivas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por NLRP3.

## 7. REFERENCIAS

- Chen GY and Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:826-37.
- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
- Lamkanfi M and Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137-61.
- Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS and Lee JY. Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases. *Arch Pharm Res*. 2021;44:16-35.
- Martinon F, Burns K and Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10:417-26.
- Place DE and Kanneganti TD. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol*. 2018;50:32-38.
- Angosto-Bazarra D, Molina-Lopez C, Penin-Franch A, Hurtado-Navarro L and Pelegrin P. Techniques to study inflammasome activation and inhibition by small molecules. *Molecules*. 2021;26:1704.
- Schroder K and Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140:821-32.
- Li Y, Huang H, Liu B, Zhang Y, Pan X, Yu XY, Shen Z and Song YH. Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6:247.
- Sharma D and Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*. 2016;213:617-29.
- Martinon F, Mayor A and Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229-65.
- Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F and Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015;526:660-5.
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E and Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481:278-86.
- Franchi L, Warner N, Viani K and Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009;227:106-28.
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA and Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*. 2001;29:301-5.
- Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD and Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*. 2010;11:1136-42.
- Schattgen SA and Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunol Rev*. 2011;243:109-18.
- Lugrin J and Martinon F. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunol Rev*. 2018;281:99-114.
- Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL and Aksentijevich I. The Pyrin inflammasome in health and disease. *Front Immunol*. 2019;10:1745.
- Mata-Martinez E, Diaz-Munoz M and Vazquez-Cuevas FG. Glial cells and brain diseases: Inflammasomes as relevant pathological entities. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:929529.
- Liao Y, Liu K and Zhu L. Emerging roles of inflammasomes in cardiovascular diseases. *Front Immunol*. 2022;13:834289.
- de Zoete MR, Palm NW, Zhu S and Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a016287.
- Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG and Ting JP. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:8041-6.
- Sharif H, Wang L, Wang WL, Magupalli VG, Andreeva L, Qiao Q, Hauenstein AV, Wu Z, Nunez G, Mao Y and Wu H. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature*. 2019;570:338-343.
- Swanson KV, Deng M and Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19:477-489.
- Latz E, Xiao TS and Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:397-411.
- Ruhl S and Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *Eur J Immunol*. 2015;45:2927-36.
- Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, Robertson AA, Cooper MA, Graf T and Hornung V. Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway. *Immunity*. 2016;44:833-46.
- Blevins HM, Xu Y, Biby S and Zhang S. The NLRP3 inflammasome pathway: a review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:879021.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN and Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 beta-processing inflammasome with



- increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunology*. 2004;20:319-25.
31. Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson KJ, Finucane O, Larkin C, Mills EL, Robertson AAB, Cooper MA, O'Neill LAJ and Lynch MA. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-beta and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun*. 2017;61:306-316.
  32. Wallisch JS, Simon DW, Bayir H, Bell MJ, Kochanek PM and Clark RSB. Cerebrospinal fluid NLRP3 is increased after severe traumatic brain injury in infants and children. *Neurocrit Care*. 2017;27:44-50.
  33. Sharma BR and Kanneganti TD. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol*. 2021;22:550-559.
  34. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V and Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357-61.
  35. Kahlenberg JM and Kaplan MJ. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26:475-81.
  36. Spel L and Martinon F. Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis. *Immunol Rev*. 2020;294:48-62.
  37. Mathews RJ, Robinson JI, Battellino M, Wong C, Taylor JC, Biologics in Rheumatoid Arthritis G, Genomics Study S, Eyre S, Churchman SM, Wilson AG, Isaacs JD, Hyrich K, Barton A, Plant D, Savic S, Cook GP, Sarzi-Puttini P, Emery P, Barrett JH, Morgan AW and McDermott MF. Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1202-10.
  38. Fleshner M, Frank M and Maier SF. Danger signals and inflammasomes: stress-evoked sterile inflammation in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42:36-45.
  39. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL and Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17:158.
  40. Karki R and Kanneganti TD. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:197-214.
  41. Vora SM, Lieberman J and Wu H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021;21:694-703.
  42. de las Heras B and Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8:28-39.
  43. Jimenez-Garcia L, Higuera MA, Herranz S, Hernandez-Lopez M, Luque A, de Las Heras B and Hortelano S. A hispanolone-derived diterpenoid inhibits M2-Macrophage polarization in vitro via JAK/STAT and attenuates chitin induced inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2018;154:373-383.
  44. Marco JL. Isolation, reactivity, pharmacological activities and total synthesis of hispanolone and structurally related diterpenes from Labiatae plants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020;30:127498.
  45. Kishore V, Yarla NS, Bishayee A, Putta S, Malla R, Neelapu NR, Challa S, Das S, Shiralgi Y, Hegde G and Dhananjaya BL. Multi-targeting Andrographolide and its natural analogs as potential therapeutic agents. *Curr Top Med Chem*. 2017;17:845-857.
  46. Hortelano S, Gonzalez-Cofrade L, Cuadrado I and de Las Heras B. Current status of terpenoids as inflammasome inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2020;172:113739.
  47. Hua F, Shi L and Zhou P. Phenols and terpenoids: natural products as inhibitors of NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases. *Inflammopharmacology*. 2022;30:137-147.
  48. Islam MT, Bardaweel SK, Mubarak MS, Koch W, Gawel-Beben K, Antosiewicz B and Sharifi-Rad J. Immunomodulatory effects of diterpenes and their derivatives through NLRP3 inflammasome pathway: a review. *Front Immunol*. 2020;11:572136.
  49. Del Prado-Audelo ML, Cortes H, Caballero-Floran IH, Gonzalez-Torres M, Escutia-Guadarrama L, Bernal-Chavez SA, Giraldo-Gomez DM, Magana JJ and Leyva-Gomez G. Therapeutic applications of terpenes on inflammatory diseases. *Front Pharmacol*. 2021;12:704197.
  50. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, Meng R, Quong AA, Latz E, Scott CP and Alnemri ES. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem*. 2010;285:9792-9802.
  51. Chinta PK, Tambe S, Umrani D, Pal AK and Nandave M. Effect of parthenolide, an NLRP3 inflammasome inhibitor, on insulin resistance in high-fat diet-obese mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2022;100:272-281.
  52. Tan WSD, Liao W, Zhou S and Wong WSF. Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*. 2017;139:71-81.
  53. Lo CW, Lii CK, Hong JJ, Chuang WT, Yang YC, Huang CS and Chen HW. Andrographolide inhibits IL-1beta release in bone marrow-derived macrophages and monocyte infiltration in mouse knee joints induced by monosodium urate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021;410:115341.
  54. Cabrera D, Wree A, Povero D, Solis N, Hernandez A, Pizarro M, Moshage H, Torres J, Feldstein AE, Cabello-Verrugio C, Brandan E, Barrera F, Arab JP and Arrese M. Andrographolide ameliorates inflammation and fibrogenesis and attenuates inflammasome activation in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*. 2017;7:3491.
  55. Guo W, Sun Y, Liu W, Wu X, Guo L, Cai P, Wu X, Wu X, Shen Y, Shu Y, Gu Y and Xu Q. Small molecule-driven mitophagy-mediated





- NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. *Autophagy*. 2014;10:972-85.
56. Liu YT, Chen HW, Lii CK, Jhuang JH, Huang CS, Li ML and Yao HT. A diterpenoid, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide, in *Andrographis paniculata* reduces steatohepatitis and liver injury in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Nutrients*. 2020;12:523.
  57. Li T, Zhang C, Wei Y, Zhong H, Shan L, Yu P, Wang Y and Xu L. Andrographolide derivative AL-1 ameliorates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome and lung permeability. *Curr Pharm Des*. 2022;28:2508-2517.
  58. Peng S, Gao J, Liu W, Jiang C, Yang X, Sun Y, Guo W and Xu Q. Andrographolide ameliorates OVA-induced lung injury in mice by suppressing ROS-mediated NF-kappaB signaling and NLRP3 inflammasome activation. *Oncotarget*. 2016;7:80262-80274.
  59. Song Z, Wang L, Cao Y, Liu Z, Zhang M, Zhang Z, Jiang S, Fan R, Hao T, Yang R, Wang B, Guan Z, Zhu L, Liu Z, Zhang S, Zhao L, Xu Z, Xu H and Dai G. Isoandrographolide inhibits NLRP3 inflammasome activation and attenuates silicosis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2022;105:108539.
  60. Li X, Wang T, Zhang D, Li H, Shen H, Ding X and Chen G. Andrographolide ameliorates intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury by inhibiting neuroinflammation induction. *Neuropharmacology*. 2018;141:305-315.
  61. Ahmed S, Kwatra M, Ranjan Panda S, Murty USN and Naidu VGM. Andrographolide suppresses NLRP3 inflammasome activation in microglia through induction of parkin-mediated mitophagy in in-vitro and in-vivo models of Parkinson disease. *Brain Behav Immun*. 2021;91:142-158.
  62. Wang S, Yang H, Yu L, Jin J, Qian L, Zhao H, Xu Y and Zhu X. Oridonin attenuates Abeta1-42-induced neuroinflammation and inhibits NF-kappaB pathway. *PLoS One*. 2014;9:e104745.
  63. He H, Jiang H, Chen Y, Ye J, Wang A, Wang C, Liu Q, Liang G, Deng X, Jiang W and Zhou R. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat Commun*. 2018;9:2550.
  64. Zhao X, Liu Y, Wang L, Yan C, Liu H, Zhang W, Zhao H, Cheng C, Chen Z, Xu T, Li K, Cai J and Qiao T. Oridonin attenuates hind limb ischemia-reperfusion injury by modulating Nrf2-mediated oxidative stress and NLRP3-mediated inflammation. *J Ethnopharmacol*. 2022;292:115206.
  65. Liu D, Qin H, Yang B, Du B and Yun X. Oridonin ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through inhibition of the NLRP3 inflammasome. *Drug Dev Res*. 2020;81:526-533.
  66. Li M, Zhang Y, Qiu S, Zhuang W, Jiang W, Wang C, Zhang S, Zhou Z, Sun T, Ke Z, Guo W, Qiao Y and Shi X. Oridonin ameliorates noise-induced hearing loss by blocking NLRP3 - NEK7 mediated inflammasome activation. *Int Immunopharmacol*. 2021;95:107576.
  67. Wu L, Chen M, Li M, Wang Y, Li Y, Zheng L, Ke Z, Liu K, Qiao Y and Shi X. Oridonin alleviates kanamycin-related hearing loss by inhibiting NLRP3/caspase-1/gasdermin D-induced inflammasome activation and hair cell pyroptosis. *Mol Immunol*. 2022;149:66-76.
  68. Gao RF, Li X, Xiang HY, Yang H, Lv CY, Sun XL, Chen HZ, Gao Y, Yang JS, Luo W, Yang YQ and Tang YH. The covalent NLRP3-inflammasome inhibitor Oridonin relieves myocardial infarction induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling in mice. *Int Immunopharmacol*. 2021;90:107133.
  69. Yang H, Huang J, Gao Y, Wen Z, Peng L and Ci X. Oridonin attenuates carrageenan-induced pleurisy via activation of the KEAP-1/Nrf2 pathway and inhibition of the TXNIP/NLRP3 and NF-kappaB pathway in mice. *Inflammopharmacology*. 2020;28:513-523.
  70. Pan XC, Liu Y, Cen YY, Xiong YL, Li JM, Ding YY, Tong YF, Liu T, Chen XH and Zhang HG. Dual role of Triptolide in interrupting the NLRP3 Inflammasome Pathway to attenuate cardiac fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20:360.
  71. Li R, Lu K, Wang Y, Chen M, Zhang F, Shen H, Yao D, Gong K and Zhang Z. Triptolide attenuates pressure overload-induced myocardial remodeling in mice via the inhibition of NLRP3 inflammasome expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485:69-75.
  72. Shen J, Ma H and Wang C. Triptolide improves myocardial fibrosis in rats through inhibition of nuclear factor kappa B and NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome pathway. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2021;25:533-543.
  73. He L, Peng X, Liu G, Tang C, Liu H, Liu F, Zhou H and Peng Y. Anti-inflammatory effects of triptolide on IgA nephropathy in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37:421-427.
  74. Yu X, Zhao Q, Zhang X, Zhang H, Liu Y, Wu X, Li M, Li X, Zhang J, Ruan X and Zhang H. Celastrol ameliorates inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Oncotarget*. 2017;8:67300-67314.
  75. Shaker ME, Ashamallah SA and Houssen ME. Celastrol ameliorates murine colitis via modulating oxidative stress, inflammatory cytokines and intestinal homeostasis. *Chem Biol Interact*. 2014;210:26-33.
  76. Jing M, Yang J, Zhang L, Liu J, Xu S, Wang M, Zhang L, Sun Y, Yan W, Hou G, Wang C and Xin W. Celastrol inhibits rheumatoid arthritis through the ROS-NF-kappaB-NLRP3 inflammasome axis. *Int Immunopharmacol*. 2021;98:107879.
  77. Zhang C, Zhao M, Wang B, Su Z, Guo B, Qin L, Zhang W and Zheng R. The Nrf2-NLRP3-caspase-1 axis mediates the neuroprotective effects of Celastrol in Parkinson's disease. *Redox Biol*. 2021;47:102134.
  78. Yan CY, Ouyang SH, Wang X, Wu YP, Sun WY, Duan WJ, Liang L, Luo X, Kurihara H, Li YF and He RR. Celastrol ameliorates Propionibacterium acnes/LPS-induced liver damage and MSU-induced gouty arthritis via inhibiting K63 deubiquitination of NLRP3. *Phytomedicine*. 2021;80:153398.
  79. Dai W, Wang X, Teng H, Li C, Wang B and Wang J. Celastrol inhibits





- microglial pyroptosis and attenuates inflammatory reaction in acute spinal cord injury rats. *Int Immunopharmacol*. 2019;66:215-223.
80. Gugliandolo E, D'Amico R, Cordaro M, Fusco R, Siracusa R, Crupi R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S and Di Paola R. Neuroprotective effect of artesunate in experimental model of traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2018;9:590.
81. Cui Y, Weng W, Ding Q, Su Q and Wang X. The protective effect of artesunate on LPS-induced acute respiratory distress syndrome through inhibiting NLRP3 inflammasome signaling. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:7655033.
82. Gonzalez-Cofrade L, Oramas-Royo S, Cuadrado I, Amesty A, Hortelano S, Estevez-Braun A and de Las Heras B. Dehydrohispanolone derivatives attenuate the inflammatory response through the modulation of inflammasome activation. *J Nat Prod*. 2020;83:2155-2164.
83. Gonzalez-Cofrade L, Cuadrado I, Amesty A, Estevez-Braun A, de Las Heras B and Hortelano S. Dehydroisohispanolone as a promising NLRP3 inhibitor agent: bioevaluation and molecular docking. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15:825.
84. Eisa NH, El-Sherbiny M and Abo El-Magd NF. Betulin alleviates cisplatin-induced hepatic injury in rats: Targeting apoptosis and Nek7-independent NLRP3 inflammasome pathways. *Int Immunopharmacol*. 2021;99:107925.

Si desea citar nuestro artículo:

**Terpenos: una nueva estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias mediadas por el inflammasoma NLRP3**

Beatriz de las Heras Polo

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 501-512

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.17>

# ADAPTACIÓN DE LA MÉDULA ADRENAL AL ESTRÉS: IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS

## ADAPTATION OF THE ADRENAL MEDULLA TO STRESS: PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS

Luis Alcides Olivos-Oré<sup>1,2</sup>, Marina Arribas-Blázquez<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Victoria Barahona Gomariz<sup>1,2</sup>, Celia Llorente Sáez<sup>1</sup> y Antonio R. Artalejo<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, e Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos, 28040 Madrid, España.

<sup>3</sup> Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** antonio.artalejo@vet.ucm.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

No hay vida sin estrés y sin adaptación al estrés no hay vida. Y esa adaptación requiere de la intervención del sistema nervioso para una adecuada coordinación y ajuste de la intensidad de la respuesta a los estímulos estresantes (estresores). El sistema nervioso simpático es el principal responsable de las respuestas rápidas de adaptación al estrés, de las que el ejemplo clásico es la respuesta de "lucha o huida". Esta respuesta está mediada por la adrenalina procedente de la médula adrenal y la noradrenalina procedente tanto de la médula adrenal como de las neuronas simpáticas posganglionares. Sin embargo, una activación simpática inadecuada, tanto en duración como en intensidad, puede estar en el origen de diversas enfermedades "relacionadas con el estrés" (hipertensión arterial insuficiencia cardiaca, dolor, etc.). Aunque tradicionalmente se ha considerado al sistema nervioso simpático como una unidad funcional, progresivamente ha ido abriéndose paso la idea de una contribución a la respuesta al estrés diferenciada entre la médula adrenal y las neuronas simpáticas ganglionares, con implicaciones fisiopatológicas también diferenciadas.

#### ABSTRACT

*There is no life without stress and without adaptation to stress there is no life. Adaptation to stress requires the intervention of the nervous system for proper coordination and adjustment of the intensity of the response to stressful stimuli (stressors). The sympathetic nervous system is primarily responsible for rapid adaptive responses to stress, of which the classic example is the "fight or flight" response. This response is mediated by adrenaline secreted from the adrenal medulla and noradrenaline released both from the adrenal medulla and postganglionic sympathetic neurons. However, inadequate sympathetic activation, both in duration and intensity, may be at the origin of several "stress-related" diseases (hypertension, heart failure, pain, etc.). Although the sympathetic nervous system has traditionally been viewed as a one functional unit, the idea of a differentiated contribution to the stress response between the adrenal medulla and the sympathetic neurons, also with differentiated pathophysiological implications, is gradually gaining ground.*

#### Palabras Clave:

estrés  
sistema nervioso simpático  
médula adrenal  
célula cromafín  
enfermedades relacionadas con el estrés

#### Keywords:

stress  
sympathetic nervous system  
adrenal medulla  
chromaffin cell  
stress-related diseases



## 1. INTRODUCCIÓN

La conservación de la integridad de los organismos superiores —que alcanza su expresión más elevada en lo que denominamos salud— precisa mantener la estabilidad de su medio interno a pesar de las variaciones del entorno. A la obtención de la estabilidad a través del cambio se la conoce como homeostasia. Y a todo aquello que fuerza un cambio homeostático se lo considera estrés. Los seres vivos se encuentran inevitablemente expuestos a toda clase de estresores frente a los que deben poner en marcha respuestas eficaces. De muchas de estas respuestas no somos conscientes (p. ej., del aumento de la producción hepática de glucosa en los periodos de ayuno, de la dilatación de las pupilas al disminuir la iluminación), y de otras apenas nos damos cuenta (p. ej., de los cambios de la frecuencia y profundidad de la respiración). Suele tratarse de reflejos mediados por el sistema nervioso autónomo (simpático, parasimpático y entérico) o de reacciones implementadas por vía humoral en respuesta a estímulos procedentes tanto del interior como del exterior del organismo. Inicialmente, las respuestas al estrés cumplen una función adaptativa, aunque en ocasiones pueden resultar contraproducentes (respuestas incrementadas, espontáneas, carentes de acomodación, etc.) llegando a generar alteraciones patológicas (1).

Un ejemplo clásico de respuesta global del organismo ante lo que se percibe como una amenaza es la llamada de “lucha o huida”. Se manifiesta por un aumento de la frecuencia y fuerza de contracción cardíacas, broncodilatación con incremento de la frecuencia y volumen respiratorios, mayor aporte de sangre al músculo esquelético, dilatación pupilar, incremento de la sudoración y de la glucogenólisis hepática y muscular, e, incluso, modificaciones en el sistema inmune y en la coagulación sanguínea. La mayor parte de estos cambios se deben al aumento de la liberación de noradrenalina (NA) por las terminaciones nerviosas de las neuronas simpáticas posganglionares que inervan el músculo liso y cardíaco y al incremento de la adrenalina (A) circulante proveniente de la médula adrenal (2). Existen, no obstante, diferencias en la contribución del sistema simpático neural (NA) y adrenal (A) en la respuesta al estrés. Estas diferencias se deben a un diferente control a nivel central de ambos sistemas, al hecho de que la A puede actuar sobre tejidos no inervados por el sistema nervioso simpático y a una distinta actuación de las dos catecolaminas sobre los receptores adrenérgicos, de forma que la A es particularmente potente para activar los receptores adrenérgicos  $\beta_2$ . Esto último explicaría las acciones metabólicas (movilización del glucógeno hepático y muscular), el incremento del flujo sanguíneo muscular y la broncodilatación que produce la A. Es de señalar también que en ratones KO para la feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT), la enzima encargada

de la síntesis de A, no se modifica la presión arterial y la función cardíaca en condiciones de reposo, pero se observa un incremento de la presión arterial en respuesta al ejercicio físico y una disminución del gasto cardíaco en animales sujetos a restricción del movimiento (3). Así mismo, el ejercicio físico prolongado conduciría en estos animales a la hipertrofia ventricular izquierda como consecuencia de un aumento sostenido de la presión arterial (4). La contribución del sistema simpático neural predomina en las respuestas al descenso de la presión arterial (ortostatismo, hemorragia), al frío, la locomoción o el ejercicio físico moderado; por su parte, el sistema simpático adrenal se activaría en situaciones de serio compromiso vital (ejercicio físico extenuante, asfixia, shock circulatorio, hipoglucemia, etc.) (5, 6).

El estrés induce la puesta en marcha de cambios adaptativos del organismo que son precedidos (estrés agudo) y acompañados (estrés crónico) de otros cambios en el sistema nervioso simpático, sin los cuales los primeros no se producirían o lo harían de forma diferente. Podríamos decir por tanto que el sistema nervioso también se adapta.

En este artículo se revisan los cambios de la médula adrenal en respuesta a estímulos estresantes y su contribución a la génesis de algunas patologías. Ciertamente, que en las respuestas al estrés crónico el eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal (HHA) y, consiguientemente, los esteroides córticoadrenales desempeñan un papel crucial. Además, frente a la mayoría de los estímulos estresantes la secreción de corticosteroides se correlaciona mejor con la de A que con la de NA (7). Ello implica una respuesta integral de la glándula adrenal aunque la regulación de la médula y la corteza obedezca a mecanismos diferentes. Por ello, en este artículo se revisan exclusivamente los mecanismos implicados en la respuesta de la médula adrenal.

## 2. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN EN LAS CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA ADRENAL

La médula adrenal ocupa la región central de la glándula adrenal, cuya parte externa, la corteza, sintetiza y libera las hormonas corticosteroideas (glucocorticoides o esteroides del estrés, mineralcorticoides y esteroides sexuales). Las células cromafines constituyen el parénquima de la médula adrenal y almacenan catecolaminas (A y, en menor proporción, NA y dopamina) en gránulos de secreción (gránulos cromafines). La médula adrenal está inervada por fibras colinérgicas del nervio esplácnico mayor que forman sinapsis con las células cromafines. En la hendidura sináptica la acetilcolina se combina con receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos de la membrana produciendo un cambio en el potencial de membrana (potencial sináptico) que desencadenará uno o varios

potenciales de acción (8, 9). La liberación de las catecolaminas se produce mediante el mecanismo de la exocitosis, que conlleva la fusión de la membrana del gránulo de secreción con la membrana plasmática, y es desencadenado fundamentalmente por el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula con cada potencial de acción a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) y alto umbral de activación (de los tipos L, N, P/Q y R; *high threshold exocytosis*) (10, 11). La respuesta secretora de catecolaminas y, en última instancia, la respuesta al estrés se encuentra regulada también a nivel tisular ya que tanto el patrón de inervación de las células cromafines, que muestra una divergencia elevada (una fibra del nervio esplácnico inerva a 80-100 células cromafines), como la existencia de uniones en hendidura (*gap junctions*) entre las células cromafines coordinan y aseguran la respuesta secretora del conjunto del tejido adreno-medular.

En todos los aspectos que acabamos de mencionar de la función de la médula adrenal (transmisión sináptica, disparo de potenciales de acción por la célula cromafín e integración tisular) intervienen canales iónicos. Además, muchos de estos canales modifican su actividad y sus niveles de expresión durante las respuestas al estrés, haciendo posible la adaptación del organismo tanto frente a estímulos agudos como crónicos (12, 13) (Figura 1).

### 3. TRANSMISIÓN COLINÉRGICA EN LA SINAPSIS ESPLACNO-CROMAFÍN

En situación de reposo y durante la respuesta inicial al estrés, la señalización en la sinapsis esplanocromafín depende de la activación de receptores nicotínicos. Se trata de canales iónicos activados por la acetilcolina con arquitectura pentamérica que dejan pasar cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) a favor de su gradiente electroquímico con la consiguiente despolarización de la membrana celular (14). Se trata de un cambio rápido y transitorio denominado potencial sináptico excitador rápido (fEPSP) que, si alcanza el nivel umbral necesario, puede desencadenar un potencial de acción en la célula cromafín. Los receptores nicotínicos de las células cromafines están compuestos por diferentes subunidades. En todas las especies animales estudiadas (hombre, vaca, rata y ratón) se ha descrito la presencia de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 7$ , capaces de formar receptores homoméricos ( $\alpha 7$ ) y heteroméricos (incorporan otras subunidades como la  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$ ) (15, 16). En las células cromafines humanas se ha descrito que la interacción física entre los receptores  $\alpha 7$  y los  $\alpha 3\beta 4$  permite prevenir su desensibilización cuando los dos receptores son activados simultáneamente (17). El hecho de que la expresión del receptor

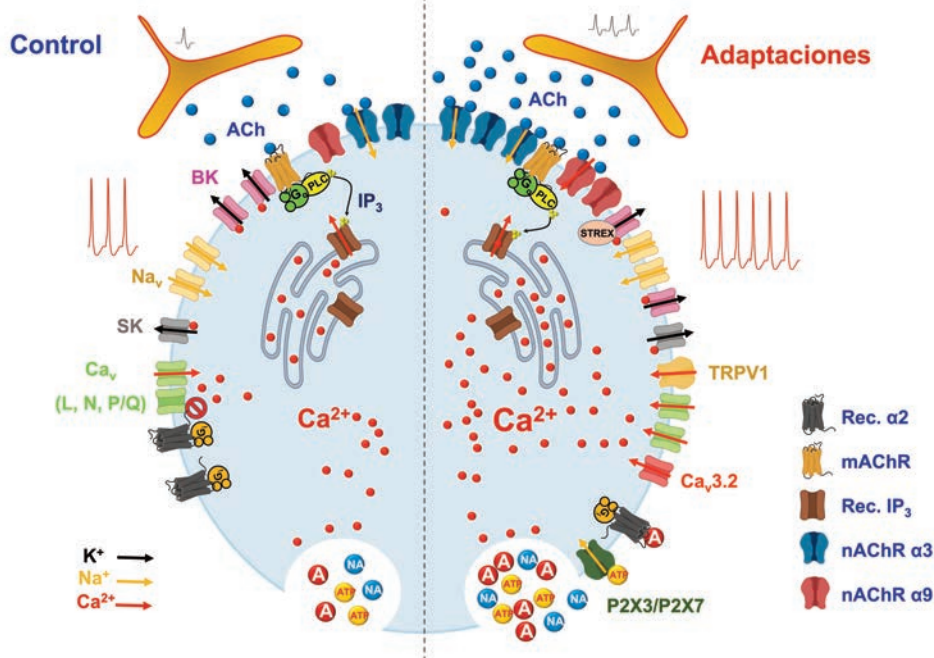


Figura 1. Principales adaptaciones de la médula adrenal al estrés agudo y crónico. Se ilustran los distintos tipos de canales iónicos y mecanismos implicados en el acoplamiento excitación-secreción de adrenalina (A), noradrenalina (NA) y ATP por las células cromafines, tanto en situación control (Control) como de estrés (Adaptaciones). En particular, se destacan las siguientes adaptaciones: a) aumento de la frecuencia de descarga de potenciales de acción en las terminaciones del nervio esplácnico con el consiguiente aumento de la liberación de acetilcolina (ACh); b) aumento de la expresión de receptores nicotínicos (nAChR)  $\alpha 9$ ; c) expresión de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) de tipo T ( $\text{Ca}_v 3.2$ ); d) expresión de la isoforma STREX de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia iónica (BK); e) expresión del canal TRPV1 y de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X3 y P2X7; f) aumento del almacenamiento y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico; g) internalización del receptor adrenérgico  $\alpha_2$  (Rec.  $\alpha_2$ ) y pérdida de la inhibición de la liberación de A; h) todo ello conduce a un aumento de la frecuencia de descarga de potenciales de acción por las células cromafines y el incremento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  con una mayor liberación exocitótica de A, NA y ATP. mAChR: receptor muscarínico; PLC: fosfolipasa C;  $\text{IP}_3$ : inositol 1,4,5-trisfosfato; Rec.  $\text{IP}_3$ : receptor de  $\text{IP}_3$ ;  $\text{G}_i$ : proteína  $\text{G}_i$  heterotrimérica;  $\text{G}_q$ : proteína  $\text{G}_q$  heterotrimérica;  $\text{Na}_v$ : canal de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje;  $\text{K}_v$ : canal de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje; SK: canal de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de pequeña conductancia iónica.



$\alpha 7$  se encuentre regulada por los corticosteroides ha llevado a proponer que su participación en la transmisión en la unión esplanco-cromafín podría verse incrementada en situaciones de estrés crónico (8). Es posible además que esta mayor contribución pueda en parte deberse a un aumento de la colocalización con los receptores  $\alpha 3\beta 4$ .

En las células cromafines de roedores (rata y ratón) se ha identificado también la subunidad  $\alpha 9$ , capaz de constituir receptores tanto homoméricos como heteroméricos (en asociación, entre otras, con la subunidad  $\alpha 10$ ) (18). Curiosamente, los receptores constituidos por las subunidades  $\alpha 9$  modificarían el potencial de membrana en sentido hiperpolarizante. Ello se debería a su elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y a su colocalización con canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de pequeña conductancia iónica (SK). Por ello, la estimulación nicotínica es capaz de activar los canales SK, siendo este efecto bloqueado por antagonistas selectivos de los receptores nicotínicos  $\alpha 9$  como la  $\alpha$ -conotoxina RgIA. Además, tanto esta toxina como la apamina, un bloqueante de los canales SK, aumentan la duración de los fEPSP inducidos por la estimulación eléctrica de las terminaciones del nervio esplácnico (15), lo que sugiere que, a través de los canales SK, los receptores  $\alpha 9$  podrían prevenir el bloqueo por despolarización de la neurotransmisión que aparece en situaciones de estrés. Sin embargo, el papel del receptor nicotínico  $\alpha 9$  no se limitaría a las situaciones de estrés agudo. Se ha comprobado que la expresión del receptor  $\alpha 9$  aumenta de forma selectiva (en relación a los receptores  $\alpha 3$  y  $\alpha 7$ ) en ratas sometidas a estrés crónico (5 días) por frío ( $4^\circ\text{C}$ ) (18, 19) (Figura 1). Se trata, por tanto, de un ejemplo de plasticidad sináptica, que junto a otros cambios en la dotación y actividad de canales iónicos que se describen a continuación, posibilita la modificación de la actividad eléctrica de las células cromafines para lograr un aumento de la secreción de catecolaminas en condiciones de estrés.

#### 4. EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DE CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN EL DISPARO DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN

Como ya se ha mencionado, la respuesta secretora de las células cromafines se desencadena por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales  $\text{Ca}_v$  activados fundamentalmente durante el potencial de acción. La descarga de un único potencial de acción resulta habitualmente insuficiente para elevar la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta el nivel necesario (rango  $\mu\text{M}$ ) para inducir la exocitosis de las catecolaminas (20), por lo que se requiere el disparo repetido de potenciales de acción, tanto espontáneos (resultantes de pequeñas despolarizaciones como las producidas por el bloqueo de la corriente de  $\text{K}^+$  de tipo M o el incremento de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) como inducidos por la actividad sináptica (sucesión de fEPSPs con potenciales de acción asociados) para activar eficazmente la respuesta secretora de las células cromafines.

Un canal iónico que desempeña un papel fundamental en la adaptación de las células cromafines durante el estrés es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T (en concreto, el  $\text{Ca}_v 3.2$ ). Este canal presenta un umbral de activación bajo ( $V_{50} \approx -55 \text{ mV}$ ) y una inactivación rápida (decenas de ms) a potenciales positivos. Además, el hecho de que la activación y la inactivación en el estado estacionario se solapen da lugar a una corriente continua (*window current*) a potenciales próximos al de reposo ( $\approx -50 \text{ mV}$ ). El nivel de expresión de estos canales en las células cromafines de animales adultos (vaca, rata y ratón) es muy bajo. Sin embargo, su número y actividad aumentan en situaciones de estrés (*stress-induced channels*) (21) (Figura 1). Los estímulos capaces de inducir esta respuesta adaptativa en las células cromafines son muy diferentes. Algunos actúan rápidamente (minutos), como el PACAP (polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria) o la estimulación simpática de alta frecuencia, mientras que otros, como la hipoxia o la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\beta_1$ , lo hacen más lentamente (horas o días) (22). El aumento de los canales  $\text{Ca}_v$  de tipo T posibilita la disminución de la corriente necesaria para alcanzar el umbral de disparo de los potenciales de acción (reobase) gracias a la capacidad de estos canales para activarse con pequeñas despolarizaciones y, a su vez, contribuir a despolarizar la membrana celular. Los canales  $\text{Ca}_v$  de tipo T serían también capaces de contribuir de forma directa a la exocitosis (*low-threshold exocytosis*) (23), particularmente cuando se producen despolarizaciones pequeñas y sostenidas del potencial de membrana como consecuencia de la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  o durante la descarga de potenciales de acción en ráfagas de alta frecuencia (24).

Aunque se ha propuesto la participación de diversos factores de transcripción y cascadas de señalización en el incremento de la expresión del canal  $\text{Ca}_v 3.2$  (gen *CACNA1H*), un punto de convergencia de varios de ellos sería la proteína quinasa C (PKC). La actividad de esta enzima aumentaría secundariamente a la activación de la fosfolipasa C, con el consiguiente reclutamiento de Epac (*exchange protein activated by cAMP*), y por el incremento de especies reactivas de oxígeno. Por su parte, la PKC podría fosforilar a la ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) que, a su vez, podría activar factores de transcripción como CREB (*cAMP responsive element binding protein*) o actuar sobre factores inducibles por la hipoxia como HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  para estimular la síntesis del canal  $\text{Ca}_v 3.2$  (19).

Los canales  $\text{Ca}_v$  (L, N, P/Q y R) de alto umbral de activación ( $V_{50} \approx -10 \text{ mV}$ ) son los principales mediadores de la elevación de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines. La expresión de los distintos tipos de estos canales varía en función de la especie animal, predominando los canales de tipo L en el hombre, el gato, la rata y el ratón, y los de tipo N y P/Q en la vaca. Todos ellos son modulados





de forma autocrina por sustancias coalmacenadas y liberadas por las vesículas de secreción (péptidos opioides, ATP y las propias catecolaminas). Esta modulación suele ser de carácter inhibitorio y se ejerce directamente sobre el canal por las proteínas G de los receptores correspondientes (opioide  $\mu$ , purinérgicos P2Y y adrenérgicos  $\alpha_2$ ). Por otra parte, la activación de receptores de PACAP y adrenérgicos  $\beta_1$  aumenta la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal de tipo L mediante la elevación del AMPc y la fosforilación del canal dependiente de la proteína quinasa A (PKA) (25).

Los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de elevada conductancia iónica (canales BK) también influyen en la capacidad de las células cromafines para sostener la descarga de potenciales de acción. Los canales BK dominan la corriente de salida de  $\text{K}^+$  de las células cromafines a potenciales en el rango de activación de los canales  $\text{Ca}_v$  de alto umbral. En consecuencia, desempeñan un papel esencial en la repolarización de los potenciales de acción que dependen de la entrada de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ . La subunidad  $\alpha$ , formadora del poro de los canales BK de las células cromafines, presenta ajuste (*splicing*) alternativo del exón STREX (*stress axis-regulated exon*) que codifica una región localizada en el extremo carboxilo del canal. La incorporación de este exón al canal BK conduce a un desplazamiento hacia la izquierda (20-36 mV en sentido hiperpolarizante) de la curva de activación del canal, lo que se asocia a una activación más rápida y una desactivación más lenta del mismo reduciendo la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y posibilitando así la descarga sostenida de potenciales de acción. La dependencia hormonal de este proceso de ajuste se manifiesta por la práctica desaparición de la variante STREX del canal BK en ratas hipofisectomizadas, mientras que la terapia de sustitución con corticotropina previene el efecto de la hipofisectomía (26). Más relevante de cara a su implicación en las respuestas adaptativas al estrés crónico, es el aumento del ARNm correspondiente a la variante STREX del canal BK en la médula adrenal de ratones que desarrollan un comportamiento dominante cuando son sometidos a un modelo de estrés social consistente en el cambio diario de compañero de jaula durante 19 días (27) (Figura 1). Este hallazgo pondría de manifiesto una nueva forma de interacción entre el eje HHA y el sistema simpático adrenal en la coordinación de las respuestas a los estímulos estresantes.

## 5. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SÍNTESIS DE CATECOLAMINAS

La médula adrenal es la gran reserva de A de la que dispone el organismo en situaciones de estrés. El mantenimiento de la respuesta secretora de A requiere de la síntesis continua de catecolaminas y de su rápida incorporación a los gránulos de secreción, y

que dicha síntesis se adapte al nivel de estimulación (acoplamiento excitación-síntesis) al objeto de satisfacer adecuadamente las demandas del organismo. De hecho, son los gránulos de secreción mas recientemente formados los que tienen una mayor probabilidad de liberar su contenido en catecolaminas (28, 29). El acoplamiento excitación-síntesis se logra mediante la regulación de las enzimas de la ruta biosintética (tiroxina hidroxilasa —TH—, L-aminoácido aromático descarboxilasa o DOPA descarboxilasa, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y PNMT) de las catecolaminas. Los puntos de regulación fundamentales se sitúan en la primera (TH) y la última (PNMT) enzimas de la vía. La TH (EC 1.14.16.2) cataliza la conversión de la L-tirosina en l-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Su presencia en un tejido permite catalogarlo como catecolaminérgico, con independencia de que la catecolamina que se encuentre predominantemente en el mismo sea la dopamina (sintetizada por la DOPA descarboxilasa), la NA (sintetizada por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa) o la A (sintetizada por la PNMT). La actividad de la TH está sujeta a regulación neural por las terminaciones del nervio esplácnico (30). Se trata de un mecanismo de regulación rápida a nivel postranscripcional (en 30 min se fosforila por la PKA y/o la ERK), que incrementa la actividad de la enzima, y transcripcional (en 6-8 h se incrementa el ARNm de la proteína) que aumenta la síntesis de la enzima pero que se traslada más lentamente a la actividad enzimática, por lo que no impide una caída transitoria del contenido de catecolaminas en la médula adrenal durante la estimulación de alta intensidad (31, 32, 33). Sin embargo, la repetición de los estímulos estresantes (p. ej., hipoxia, inmovilización) conduce a una elevación persistente del ARNm y al aumento sostenido de la actividad enzimática (34, 35, 36). En tanto que enzima limitante de la ruta biosintética, la TH es inhibida por los productos finales de la vía (las tres catecolaminas ya mencionadas) contribuyendo a la autorregulación del acoplamiento excitación-síntesis de catecolaminas (37, 38).

La PNMT (EC 2.1.1.28) es la enzima responsable de la síntesis de A a partir de la NA en una reacción de N-metilación que usa S-adenosil L-metionina (SAM) como cosustrato y se expresa de forma mayoritaria en la médula adrenal (39). Se trata de una enzima regulada predominantemente por los glucocorticoides y consiguientemente por la actividad del eje HHA (40). Los mecanismos implicados en esta regulación son diversos. Uno de ellos sería indirecto, favoreciendo la síntesis de SAM que al unirse a la PNMT la protegería de la degradación. Otro mecanismo consiste en el incremento de la expresión de ARNm codificante de la PNMT dado que el promotor del gen de la PNMT contiene elementos de respuesta a glucocorticoides. Por otra parte, los efectos de los corticoides sobre el gen de la PNMT son sinérgicos con los de factores de transcripción como Egr-1 y AP-2 y pueden ser modulados por la PKA (efecto estimulador) y la PKC (efecto inhibitorio), lo que añadiría complejidad



a la regulación hormonal de la PNMT al vincularla con la actividad de las células cromafines (41). La PNMT está también sujeta a regulación neural. En particular, por la acetilcolina liberada por la estimulación de las terminaciones del nervio esplácnico que activa la transcripción del gen y la síntesis de PNMT tras combinarse con receptores nicotínicos y muscarínicos. Al igual que en el caso de los glucocorticoides, los efectos de la acetilcolina estarían regulados por Egr-1, PKA y PKC (40). Así mismo, el PACAP, un cotransmisor de la acetilcolina en la sinapsis esplancocromafín, estimula la transcripción del gen de la PNMT de forma dependiente del incremento de AMPc, con la subsiguiente activación de la PKA y de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales  $\text{Ca}_v$  de tipo L. Cabe señalar que el efecto de este transmisor sobre la síntesis de A y su liberación exocitótica no manifiesta tolerancia, a diferencia de lo que ocurre con el de la acetilcolina (42). Como acaba de explicarse, en la regulación de esta enzima se integran los dos sistemas efectores fundamentales de la respuesta al estrés en la periferia: el eje HHA y el sistema nervioso simpático. En el modelo experimental de estrés consistente en la inmovilización se produce una marcada activación de ambos sistemas y el aumento de los niveles circulantes de corticosterona y A (43, 44), lo que ha llevado a su utilización para el estudio de los efectos del estrés sobre la ruta biosintética de las catecolaminas en la médula adrenal (32, 45). En este modelo, la inmovilización aguda y crónica (incluyendo la repetición de episodios agudos) se asocia al aumento de la expresión y actividad de todas las enzimas de la vía biosintética. No obstante, la respuesta enzimática parece modificarse también con el tipo de estresor. Así, el aislamiento social crónico se asocia a una menor transcripción del ARNm de la TH, si bien estos animales crónicamente estresados también experimentarían un aumento de la expresión del gen de la TH y de los niveles de A circulante cuando son expuestos a un estrés agudo (46, 47). Un patrón de respuesta similar se observa en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (véase más adelante).

## 6. CONTRIBUCIÓN DE LA MÉDULA ADRENAL A LAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ESTRÉS

Incrementos en la duración de los estímulos estresantes y particularmente de su frecuencia son capaces de convertir una respuesta adaptativa (p. ej., la vasoconstricción y aumento transitorio de la presión arterial) frente estímulos físicos (frío), metabólicos (ejercicio) o psíquicos (miedo, angustia, etc.) en maladaptativa, al favorecer la aparición (influencia en la patogenia) o el desarrollo (influencia en la fisiopatología) de diversas patologías. Como se describe a continuación, se trataría de enfermedades relacionadas con el estrés (ya que en la mayoría de ellas no existe una relación causal entre el estrés y la enfermedad), que pueden producirse tanto

por acumulación de los efectos de las respuestas al estrés como por una pérdida de las mismas (hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, dolor, ansiedad, depresión). Por otra parte, es importante diferenciar estas enfermedades de las debidas (parálisis supranuclear progresiva, algunas formas de la enfermedad de Parkinson, hipertrofia ventricular, hipotensión postural, etc.) a alteraciones genéticas (incluyendo cambios en la expresión de isoformas y polimorfismos de un solo nucleótido) de las enzimas de la ruta biosintética de las catecolaminas (4, 48, 49), cuya génesis no reside en una respuesta maladaptativa a los estresores sino en un daño primario del sistema nervioso catecolaminérgico.

### 6.1. Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome con elevada prevalencia y mortalidad para la que en actualidad no se dispone de un tratamiento farmacológico satisfactorio. Presenta una etiología y patogenia variadas pero una fisiopatología dominada por un conjunto de respuestas adaptativas, mediadas por el sistema nervioso simpático y el eje renina-angiotensina-aldosterona (RAA), cuyo objetivo principal es el mantenimiento del gasto cardíaco y la perfusión tisular. La activación simpática es consecuencia de la disminución de la presión arterial y persigue su recuperación en virtud de sus efectos a nivel cardíaco (efecto inotrópico y cronotrópico positivo) y vascular (vasoconstricción). Estos efectos están mediados fundamentalmente por adrenorreceptores  $\alpha$  (vasculares) y  $\beta$  (cardíacos) activados por la NA, liberada por las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas posganglionares, y por la NA y A provenientes de la médula adrenal. Aunque los efectos de la activación simpática (y también del eje RAA) son beneficiosos a corto plazo sobre la situación hemodinámica, no actúan sobre la causa de la insuficiencia y además pueden agravar su evolución. Ello se debe a su capacidad para incrementar el consumo de oxígeno miocárdico, aumentar las resistencias vasculares y promover la remodelación mecánica (muerte de los cardiomiocitos y fibrosis compensatoria) y eléctrica (cambios en la expresión de canales iónicos) del tejido cardíaco, con el consiguiente riesgo de aparición de arritmias y disminución de la contractilidad cardíaca. Ello conduce a un círculo vicioso fisiopatológico que afecta negativamente (descompensaciones agudas, empeoramiento del estado funcional y muerte) al curso temporal de la enfermedad. Todo ello justifica el uso de fármacos simpaticolíticos (bloqueantes  $\beta$  adrenérgicos) y antagonistas del eje RAA (inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina) en el manejo de la IC crónica. Pero también el sistema nervioso simpático y en particular la médula adrenal experimenta cambios durante la IC crónica, que afectan a los mecanismos de autorregulación de su actividad y contribuyen al agravamiento de la enfermedad. Un me-



canismo de autorregulación fundamental de las células cromafines se basa en la existencia de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , identificados en los años 70 del pasado siglo como receptores presinápticos inhibidores de la liberación de NA por las terminaciones nerviosas de las neuronas simpáticas (autorreceptores) (50, 51). Estos receptores se localizan también en la membrana de las células cromafines donde actuarían como reguladores de la respuesta secretora al ser activados por las catecolaminas (A y/o NA) liberadas por la misma célula (efecto autocrino) o por células vecinas (efecto paracrino) (51). Se trata de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas que presentan diversas vías de señalización intracelular. La mejor conocida consiste en la inhibición directa de los canales  $\text{Ca}_v$  de tipo L por las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_{i/o}$  (52). La inhibición alcanza un máximo del 50% de las corrientes a través de estos canales, no afecta a la cinética de las mismas, es rápida ( $< 1s$ ) y no se revierte por la actividad eléctrica de la célula, posibilitando por ello la reducción de la respuesta secretora en situaciones de estrés en las que aumenta la frecuencia de descarga de potenciales de acción (53). Cabe señalar también que la activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  disminuye la expresión y la actividad de la TH al reducir la concentración intracelular de AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$ , evidenciando que la regulación del acoplamiento excitación-síntesis de catecolaminas es bidireccional (43).

Lo que otorga a los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  de la médula adrenal un interés particular es que su función es regulada por la actividad celular y que esta regulación tiene implicaciones fisiopatológicas. Como la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  pueden desensibilizarse e internalizarse cuando se unen a un agonista. Ello se debe a la fosforilación de la forma activa del receptor por la proteína quinasa 2 de los receptores acoplados a proteínas G (GRK2) (54). En experimentos *in vivo* se ha observado que la expresión de esta enzima está regulada por actividad de la sinapsis esplancrocromafín, de forma que la esplenectomía o la administración de antagonistas nicotínicos con efecto bloqueante ganglionar (hexametonio) reduce la expresión de la GRK2 (55). En células cromafines aisladas, son las catecolaminas (A y NA), a concentraciones en el rango nM y actuando a través de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y  $\beta$ , las que pueden incrementar la expresión de la GRK2, en un proceso que implica a quinasas ERK1/2 y Src (*stored response chain*) (56, 57). La desensibilización de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos por la GRK2 y la pérdida del control inhibitorio de la liberación de catecolaminas adquiere relevancia en situaciones en las que la estimulación crónica de la glándula adrenal y el subsiguiente incremento de la liberación de catecolaminas adquiere un carácter maladaptativo, como es el caso de la IC (58, 59) (Figura 1). En distintos modelos experimentales de IC (infarto de miocardio, constricción aórtica, hipertensión

arterial crónica) se observa una correlación entre la hipertrofia cardíaca con disminución del volumen minuto (fracción de eyección reducida) y el aumento del tamaño de la glándula adrenal, de la actividad de la TH, de la GRK2 y de los niveles circulantes de A (55). Es de destacar que la inhibición de la actividad de la GRK2 de la médula adrenal mediante el péptido  $\beta$  ARKct o la galleína reduce la secreción de catecolaminas al tiempo que atenúa la sintomatología de la IC (57, 58, 60, 61, 62); así mismo, el tratamiento con bloqueantes  $\beta$  adrenérgicos (misoprolol, metoprolol) restaura la actividad de la GRK2 y la función de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  en las células cromafines (63), lo que presumiblemente contribuiría a los efectos beneficiosos de estos fármacos en los pacientes con IC. Dado que las vías de señalización implicadas en la inhibición de la secreción de catecolaminas (proteínas  $G_{i/o}$ ) y la desensibilización del receptor  $\alpha_2$  adrenérgico (GRK2) son diferentes, es de esperar que estos hallazgos estimulen el desarrollo de agonistas sesgados (*biased*) de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos de acción periférica capaces de inhibir de forma sostenida la secreción de catecolaminas en condiciones de estimulación simpática crónicamente elevada (64).

## 6.2. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) esencial es la alteración cardiovascular mas prevalente, afectando al 12% de la población mundial, y relevante al actuar como factor de riesgo de la enfermedad coronaria, la insuficiencia cardíaca, el aneurisma disecante de la aorta, la insuficiencia renal o el accidente cerebrovascular. Si bien en su patogenia intervienen multitud de factores metabólicos (hiperlipemia, hiperglucemia, obesidad, sobrecarga de sal) y mecanismos celulares (estrés oxidativo, inflamación de bajo grado, tensión mecánica de la pared vascular, etc.), una desregulación de los sistemas homeostáticos implicados en el control de las resistencias vasculares periféricas (SNS y eje RAA) ha sido comúnmente implicada en el origen de esta enfermedad (65). Así, en algunos sujetos hipertensos se ha constatado el aumento de la renina y/o catecolaminas circulantes, lo que provee justificación para el uso de fármacos inhibidores del eje RAA (fundamentalmente los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I y los antagonistas del receptor  $\text{AT}_1$  de la angiotensina II) y simpaticolíticos (antagonistas  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos) en el tratamiento de la HTA (66). En concordancia con las anteriores observaciones, se ha registrado una mayor actividad en los nervios simpáticos en sujetos hipertensos (67).

La rata SHR es el modelo experimental más utilizado para el estudio de la HTA (68). Estos animales, a diferencia de los de la cepa control (Wistar Kyoto; WKY), desarrollan HTA (160-180 mm Hg) a las 5-12 semanas de vida, así como algunas de las alteraciones fisiopatológicas (hipertrofia ventricular izquierda, disfunción endotelial, remodelado vascular, daño renal, etc.) características de la



enfermedad en humanos (69). En la patogenia de la HTA en este modelo participaría el SNS por cuanto que la actividad simpática tanto a nivel central como periférico se eleva en paralelo con la presión arterial (70). Además, es posible limitar notablemente el desarrollo de la HTA mediante la simpactectomía química (administración de guanetidina) en ratas recién nacidas (71, 72), si bien esta intervención resulta mucho menos eficaz en rata adultas (73). Ello sugiere que existe un periodo crítico en el desarrollo de la HTA en el que intervendría el sistema simpático neural que, sin embargo, no sería el único factor implicado en la patogenia de la enfermedad. A este respecto, la médula adrenal podría también contribuir al desarrollo de la HTA. Algunos autores han descrito una mayor activación de las neuronas de las que parten las fibras del nervio esplácnico en respuesta a diversos estímulos estresantes (hipoglucemia, estrés mental, etc.), lo que se traduciría en mayores niveles de A en sangre (74). Además, la adrenomedulectomía bilateral en ratas SHR jóvenes (menos de 6 semanas) pero no en animales adultos atenúa el desarrollo de HTA, mientras que la colocación de implantes subcutáneos de A previene el efecto de la adrenomedulectomía. Cabe señalar también que esa intervención disminuye la respuesta contráctil a la estimulación simpática en las arterias mesentéricas, lo que apunta un efecto facilitador de la A sobre la liberación de NA por las terminaciones nerviosas simpáticas de los vasos (75). Así mismo, la simpactectomía y la adrenomedulectomía parecen ejercer efectos sinérgicos, ya que su combinación normaliza las cifras de presión arterial y revierte la remodelación vascular y cardíaca que se observa en estos animales (76).

En la médula adrenal de animales SHR se producen múltiples adaptaciones funcionales y estructurales (77). La estimulación colinérgica (nicotínica y muscarínica) y la despolarización directa de la membrana celular con una solución extracelular de alto  $K^+$  inducen una mayor respuesta secretora de catecolaminas en las ratas SHR que en las WKY (78; ver, no obstante, 79). El incremento de la respuesta secretora sería debido a la exocitosis de un número mayor de gránulos cromafines con, además, un mayor contenido de catecolaminas (80, 81), lo que a nivel estructural se ha relacionado con una mayor densidad de gránulos cromafines en la vecindad de la membrana plasmática (82, 83, 84). Los resultados obtenidos sobre las enzimas de la ruta biosintética de las catecolaminas son contradictorios, habiéndose descrito tanto el aumento como la disminución del ARNm y de la proteína de la TH y la PNMT (85, 86, 87, 88, 89). Análoga situación se produce en relación con el contenido adrenal de catecolaminas (A, NA y dopamina) (72, 73, 76, 87, 89). Estos resultados contradictorios se han tratado de explicar por una elevada vulnerabilidad de las ratas SHR a los estresores frecuentemente implicados en los experimentos (administración de fármacos, incluidos los anestésicos, medida de la presión arterial, método de sacrificio,

etc.) y por la capacidad de la HTA para activar a través de los barorreceptores del cuerpo carotídeo respuestas compensadoras de disminución del tono simpático. Estos factores estarían también implicados en la disminución de la actividad de la TH que se observa en ratas SHR no estresadas y el aumento drástico de la misma y de la A en sangre cuando son expuestas de forma aguda o crónica a estímulos estresantes (88).

Por otra parte, se han documentado muy diversas modificaciones en los elementos intervinientes en el acoplamiento excitación-secreción que contribuirían a la mayor liberación de catecolaminas en estos animales. Merecen destacarse la disminución de las corrientes a través de los canales  $Ca_v$  y  $K_v$ , lo que unido a una mayor acumulación y liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico favorecería elevaciones de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  de mayor amplitud y duración, con la consiguiente potenciación de la respuesta secretora (81, 90, 91, 92) (Figura 1). Es de destacar que estas alteraciones se producirían también en otros modelos experimentales de HTA como los que consisten en la administración de alcohol, de deoxicorticosterona y sal o de estreptozotocina (induce también diabetes), lo que reforzaría el vínculo entre la médula adrenal y la HTA (83, 92, 93). Además, el hecho de que en ratas SHR prehipertensas se observen también algunas de estas alteraciones, apoyaría una relación causal con la HTA (84). Cabe señalar también que a diferencia de lo que ocurre en la IC, la expresión y función de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no se ve modificada en la médula adrenal de las ratas SHR (79).

### 6.3. Hiperalgnesia y dolor neuropático

La asociación Internacional para el Estudio del Dolor define el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada con daño tisular real o potencial. La finalidad del dolor es la de alertar al individuo de una lesión orgánica al objeto de poner en marcha estrategias de evitación o protección frente a los posibles agentes capaces de agravarla (fuerza mecánica, temperatura, sustancias químicas, etc.). Comúnmente, el dolor cesa cuando la lesión que lo origina desaparece (dolor agudo). Sin embargo, en ocasiones la lesión puede perdurar en el tiempo, lo que conduce a la cronificación del dolor. En esta situación, el sistema nervioso nociceptivo modifica su funcionamiento no solo para aumentar su actividad en respuesta a los estímulos dolorosos (hiperalgnesia), como ocurre en el dolor agudo, sino también para activarse ante estímulos no dolorosos (alodinia) o incluso en ausencia de cualquier estímulo (dolor espontáneo). Se trata de modificaciones que acompañan al dolor crónico secundario a una lesión tisular (dolor nociceptivo) pero también a aquellas formas de dolor en las que el daño primario acontece sobre el propio sistema nervioso nociceptivo (dolor neuropático) o se produce en ausencia de





una lesión claramente identificable (dolor nociplástico). En consecuencia, el dolor crónico pierde cualquier carácter adaptivo y se convierte en una patología en sí misma. De hecho, constituye una importante necesidad médica no cubierta en la actualidad (94).

La relación entre el estrés y el dolor es bidireccional y compleja. Ciertamente que el dolor es una fuente de estrés (de alguna manera, “no hay dolor sin estrés”) pero el estrés también influye sobre el dolor (95, 96). Y lo hace tanto sobre el componente emocional como el sensorial del mismo. Además, esa influencia varía en función de la naturaleza del estrés. Así, el estrés agudo se ha asociado con la analgesia. Es el caso de la disminución de la percepción del dolor en situaciones en las que se produce una reacción de lucha o huida, como las que tienen lugar en determinadas prácticas deportivas y formas de ocio, o se originan en el contexto de accidentes de tráfico, conflictos bélicos, etc. En estas situaciones se suspende temporalmente la función de alerta del dolor y la analgesia cumple una función adaptativa al posibilitar al sujeto concentrarse en una tarea fundamental para su supervivencia o la consecución de algún objetivo del máximo interés. Por el contrario, el estrés crónico conlleva frecuentemente un aumento de la percepción de los estímulos dolorosos. En estas circunstancias, el estrés puede actuar como inductor de hiperalgesia en ausencia de daño tisular o como potenciador de la hiperalgesia en cuadros de dolor nociceptivo (artritis reumatoide), neuropático (lesión de un nervio periférico) y nociplástico (fibromialgia, síndrome del intestino irritable).

El estrés modula la sensación dolorosa actuando a nivel central y periférico. La analgesia asociada al estrés agudo muy probablemente se debe a la interrupción de la señalización dolorosa proveniente de la médula espinal antes de que acceda a las regiones corticales donde se hace consciente. Ello implica a estructuras troncoencefálicas (sustancia gris periacueductal, médula rostral ventral, núcleo parabraquial, locus coeruleus, entre otras) de las que parten las vías descendentes inhibitorias del dolor, de naturaleza opioide y noradrenérgica, que actúan en el asta dorsal de la médula espinal (96, 97). Por otra parte, el hipocampo, la amígdala y el tálamo han sido implicados junto con diversos núcleos del tronco del encéfalo (véase mas arriba) en la hiperalgesia térmica, mecánica, etc. inducidas en animales de experimentación por estresores como el frío, la inmovilización, la hipoglucemia, la natación forzada o la separación materna (98). Tanto el eje HHA como el sistema nervioso simpático participan en la modulación del dolor por el estrés. A veces de forma conjunta, a veces de manera independiente. En algunas formas de dolor, el sistema nervioso simpático neural parece desempeñar un papel crucial (99). Corresponden a lo que antiguamente se denominaba dolor mantenido por el sistema nervioso simpático (*sympathetically-maintained pain*) o distrofia simpática

refleja y, actualmente, síndrome doloroso regional complejo, caracterizado por la existencia de dolor espontáneo, alodinia mecánica y al frío en la periferia del organismo, ortostatismo, sudoración, etc. (100). La implicación del sistema simpático neural en la patogenia de este cuadro se basa en la mejoría del dolor que se observa tanto en clínica humana como en medicina experimental tras la práctica de una simpatectomía química (administración de guanetidina) o quirúrgica, y la recurrencia de la sintomatología al ser administrada NA por vía subcutánea (101).

Pero la médula adrenal también modula la sensación dolorosa y, además, lo hace de forma independiente del sistema simpático neural. La médula adrenal parece modular la sensación táctil en la piel en condiciones normales (ausencia de estrés) a tenor del aumento de la percepción de estímulos mecánicos en ratas a las que se ha practicado una vaguetectomía subdiafragmática, ya que ese efecto desaparece tras la realización de una adrenomedulectomía bilateral o la sección de los nervios espláncnicos (102). La contribución de la médula adrenal parece depender de la liberación de A, dado que la administración de esta hormona a animales adrenomedulectomizados consigue recuperar la sensibilidad mecánica aumentada (103, 104). La modulación de la sensibilidad dolorosa por la médula adrenal se ha evidenciado también en ratas sometidas a estrés crónico mediante la aplicación de estímulos sonoros de frecuencia variable (11-19 kHz) durante 30 min a lo largo de 4 días. Este procedimiento potencia la hiperalgesia mecánica cutánea y músculoesquelética inducida por la inyección local de bradicinina, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) o A, sustancias todas ellas con efecto proinflamatorio y proalgésico (105, 106, 107). Este fenómeno se acompaña de un incremento sostenido de los niveles sanguíneos de A y corticosterona, lo que supone la activación conjunta del eje HHA y del sistema simpático adrenal. Ambas hormonas son necesarias para la potenciación de la hiperalgesia puesto que tanto la administración de antagonistas del receptor de glucocorticoides (mifepristona) como la adrenomedulectomía revierten dicha potenciación. Cabe señalar que los efectos de la A estarían mediados por receptores adrenérgicos  $\beta_2$ , probablemente localizados en las terminaciones periféricas de las neuronas nociceptivas primarias (nociceptores), ya que pueden bloquearse por la administración de antagonistas  $\beta$  adrenérgicos (propranolol) y reproducirse con fármacos agonistas de los mismos (isoproterenol, salbutamol) (108). Es de destacar que los glucocorticoides aumentan la expresión de estos receptores, lo que explicaría el carácter permisivo de estas hormonas en la potenciación de la hiperalgesia (109). Sin embargo, la potenciación conllevaría no solo un aumento de la expresión de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  sino también un cambio en su mecanismo de transducción, consistente en un desplazamiento del acoplamiento a la proteína  $G_s$  en favor de la  $G_{i/o}$  y la activación de la





proteína quinasa  $C_g$  (110, 106). Curiosamente, los efectos de la A sobre la sensación dolorosa parecen tener dimorfismo sexual en las ratas, ya que son mas acusados en los machos que en las hembras. Ello parece deberse a la acción de los estrógenos sobre la médula adrenal en las hembras, lo que se traduciría en un aumento de la liberación de A y la desensibilización de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  de los nociceptores (111, 112). Los resultados de estos experimentos en animales de experimentación tendrían valor traslacional en humanos, ya que se han relacionado con la capacidad del estrés para agravar cuadros de dolor generalizado como la artritis reumatoide o el síndrome del intestino irritable, en los que se ha descrito un aumento de la producción de diversas interleucinas y  $PGE_2$  (113, 114), cuyos efectos algésicos podrían potenciarse por la A y corticosteroides circulantes. La eficacia analgésica de los bloqueantes  $\beta$  adrenérgicos y la capacidad de los corticosteroides para agravar la sintomatología dolorosa en algunos de estos pacientes otorgarían plausibilidad a esta hipótesis (115, 116, 117).

La médula adrenal contribuiría también de forma importante a modular la sensación dolorosa en un modelo experimental de dolor neuropático, como es el producido por la constricción crónica del nervio ciático de la rata (118). Dicho modelo comporta la aparición de alodinia térmica y mecánica a la estimulación de la superficie plantar de la extremidad afecta. En la médula adrenal de estos animales se producen muchas de las adaptaciones previamente identificadas en un modelo de estrés crónico por frío (5 días a 4 °C): aumento de la inervación colinérgica con incremento de la frecuencia de las corrientes sinápticas espontáneas de tipo nicotínico, aumento de la expresión de receptores nicotínicos  $\alpha_9$  y aumento de la exocitosis de catecolaminas en respuesta a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales  $Ca_v$  (119) (Figura 1). Ello se traduce en un aumento de la A circulante y, en particular, del cociente entre la A y la NA, probablemente como consecuencia del incremento de la expresión y actividad de la PNMT en las células cromafines (120). La implicación de la médula adrenal en la fenomenología dolorosa se evidencia por la atenuación de la alodinia mecánica tras la esplenectomía y la reversión de la misma por un inhibidor de la PNMT, el SKF29661. El efecto de SKF29661 (300 mg/kg, IP) sobre la alodinia mecánica es de rápida instauración (30 min) y no manifiesta tolerancia con la administración repetida. Dado que este fármaco carece de efecto sobre las conductancias iónicas implicadas en el acoplamiento excitación-secreción, su acción antialodínica sería probablemente debida a la inhibición de la síntesis de A y la disminución del cociente entre la A y la NA circulantes (120). Cabe señalar que en este modelo experimental se desarrolla un tono algésico catecolaminérgico dependiente de la activación de receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ , probablemente localizados en las terminaciones periféricas de las neuronas nociceptivas primarias y que se vería disminuido tras el tratamiento con SKF29661.

Debe destacarse que en las células cromafines de los animales con dolor neuropático se producen modificaciones en la regulación autocrina y paracrina de la liberación de catecolaminas. Al igual que en los animales SHR, en este modelo experimental de dolor neuropático no se observa una disminución la capacidad de los agonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos para inhibir la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales  $Ca_v$  y, consiguientemente, la exocitosis de las vesículas de secreción, lo que descartaría un proceso de desensibilización de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ . Sin embargo, se ha constatado la expresión de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X3, P2X7 y de canales TRPV1 (*transient receptor potential Vanilloid1 channel*) (119) (Figura 1). Los dos primeros son canales activados por ligando, que mediarían una despolarización de la membrana celular al combinarse con ATP y diversos dinucleótidos polifosfato almacenados y liberados en las vesículas de secreción juntamente con las catecolaminas (121, 122, 123, 124). El incremento de estos receptores contrarrestaría el efecto inhibitorio de los receptores purinérgicos P2Y sobre los canales  $Ca_v$  y la exocitosis, poniendo en marcha un proceso de realimentación positiva de la liberación del contenido de los gránulos cromafines que probablemente contribuye al tono algésico catecolaminérgico observado en estos animales (125). Los canales TRPV1 son receptores polimodales activados por la capsaicina, el pH ácido, el calor nocivo y la estimulación mecánica (126). La expresión de receptores P2X3 y del receptor polimodal TRPV1 en las células cromafines se produce también en las neuronas nociceptivas primarias del nervio ciático lesionado en los animales con dolor neuropático (127, 128). Ello refleja su común origen embrionario y probablemente la capacidad de las células cromafines para la transducción sensorial. A este respecto, debe mencionarse la liberación de catecolaminas por las células cromafines que tiene lugar durante el momento del parto en respuesta a la hipoxia, y que resulta fundamental para la adaptación cardiovascular de los recién nacidos (129, 23). Desconocemos, no obstante, la función de los receptores TRPV1 de las células cromafines en los animales con dolor neuropático.

## 7. CONCLUSIONES

En las anteriores páginas hemos pasado revista a las adaptaciones de la médula adrenal en situación de estrés agudo y crónico, y a la participación de esta glándula doblemente interna, tanto por su ubicación como por su secreción, en algunas condiciones patológicas. Los resultados presentados abundan en la idea de que la médula adrenal desempeña un papel propio en el funcionamiento del sistema nervioso simpático, bien diferenciado del del sistema simpático neural. Durante la ontogénesis las células cromafines terminan alejándose de sus parientes cercanos, las neu-

ronas simpáticas posganglionares, convirtiéndose bajo la influencia de los glucocorticoides en células neuroendocrinas, que vierten al torrente sanguíneo sus productos de secreción. La cercanía física con las células adrenocorticales facilita también la integración funcional del eje HHA y del sistema simpático adrenal y un efecto sinérgico particularmente en situaciones de estrés crónico. En la actualidad contamos con diversas opciones farmacológicas para actuar sobre la corteza adrenal y el sistema simpático neural. Las posibilidades de intervenir sobre la médula adrenal son mucho más limitadas y prácticamente se reducen a los inhibidores de la PNMT. A la vista de las evidencias revisadas en este trabajo, sería conveniente prestar atención a otras particularidades farmacológicas de las células cromafines al objeto de desarrollar compuestos selectivos para el sistema simpático adrenal (antagonistas no peptídicos de los receptores nicotínicos  $\alpha 9$ , moduladores de la interacción entre los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$ , agonistas sesgados de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , etc.) potencialmente útiles en el número creciente de patologías en las que parece estar implicado.

## 8. ABREVIATURAS

A: adrenalina  
BK: canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de elevada conductancia iónica  
 $Ca_v$ : canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje  
Egr-1: *early growth response-1*  
ERK: *extracellular signal-regulated kinase*  
fEPSP: potencial sináptico excitador rápido  
GRK2: proteína quinasa 2 de los receptores acoplados a proteínas G  
HHA: hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal  
HTA: hipertensión arterial  
IC: insuficiencia cardíaca  
 $K_v$ : canales de  $K^+$  dependientes de voltaje  
NA: noradrenalina  
PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria  
 $PGE_2$ : prostaglandina  $E_2$   
PKA: proteína quinasa A  
PKC: proteína quinasa C  
PNMT: feniletanolamina N-metil transferasa  
RAA: renina-angiotensina-aldosterona  
SHR: ratas espontáneamente hipertensas  
SK: canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de pequeña conductancia iónica (SK).  
TH: tiroxina hidroxilasa  
TRPV1: *transient receptor potential vanilloid1 channel*  
WKY: ratas Wistar Kyoto

## Agradecimientos

CLS está financiada por un contrato predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). La investigación del grupo al que pertenecen los autores está financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-109155RB-I00 y la UCM (FEI20/35).

## 9. REFERENCIAS

- McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2093-101.
- Cannon WG, De LaPaz D. Emotional stimulation of adrenal secretion. *Am J Physiol* 1911; 28: 64-70.
- Bao X, Lu CM, Liu F, et al. Epinephrine is required for normal cardiovascular responses to stress in the phenylethanolamine N-methyltransferase knockout mouse. *Circulation* 2007; 116: 1024-31.
- Mendes P, Martinho R, Leite S, et al. Chronic exercise induces pathological left ventricular hypertrophy in adrenaline-deficient mice. *Int J Cardiol* 2018; 253: 113-119.
- Pacak K, Palkovits M, Yadid G, et al. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 1998; 275: R1247-55.
- Carter JR, Goldstein DS. Sympathoneural and adrenomedullary responses to mental stress. *Compr Physiol* 2015; 5: 119-46.
- Goldstein DS. Adrenal responses to stress. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 1433-40.
- Sala F, Nistri A, Criado M. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 192: 203-12.
- Olivos L, Artalejo AR. Muscarinic excitation—secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 192: 213-20.
- Duan K, Yu X, Zhang C, Zhou Z. Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 2003; 23: 11235-43.
- García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, et al. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 2006; 86: 1093-1131.
- Artalejo AR. Canales iónicos y estrés: el caso de la médula adrenal. En: Simposio Homenaje al Profesor Antonio G. García. Fundación Teófilo Hernando 2016; pp. 126-137.
- Carbone E, Borges R, Eiden LE, et al. Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Compr Physiol*. 2019; 9: 1443-1502.
- Artalejo, AR. Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En: *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*. Hescheler, J. and Scherübl, H. (eds.). CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 1995; pp. 259-299.
- Bustillo, D. Caracterización farmacológica y funcional de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal de la rata: plasticidad inducida por un modelo de estrés crónico. Uni-



- versidad Complutense de Madrid 2015.
16. Hone AJ, Rueda-Ruzafa L, Gordon TJ, et al. Expression of  $\alpha 3\beta 2\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors by rat adrenal chromaffin cells determined using novel conopeptide antagonists. *J Neurochem* 2020; 154: 158-176.
  17. Jiménez-Pompa A, Sanz-Lázaro S, Omodolor RE, et al. Cross Talk between  $\alpha 7$  and  $\alpha 3\beta 4$  Nicotinic Receptors Prevents Their Desensitization in Human Chromaffin Cells. *J Neurosci* 2022; 42: 1173-1183.
  18. Colomer C, Olivos-Ore LA, Vincent A, et al. Functional characterization of  $\alpha 9$ -containing cholinergic nicotinic receptors in the rat adrenal medulla: implication in stress-induced functional plasticity. *J Neurosci* 2010; 30: 6732-42.
  19. Guérineau NC, Desarménien MG, Carabelli V, et al. Functional chromaffin cell plasticity in response to stress: focus on nicotinic, gap junction, and voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Mol Neurosci* 2012; 48: 368-86.
  20. Cárdenas AM, Marengo FD. How the stimulus defines the dynamics of vesicle pool recruitment, fusion mode, and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *J Neurochem* 2016; 137:867-79.
  21. Mahapatra S, Calorio C, Vandael DH, et al. Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium* 2012; 51: 321-30.
  22. Hill J, Chan SA, Kuri B, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) recruits low voltage-activated T-type calcium influx under acute sympathetic stimulation in mouse
  23. Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, et al. Chronic hypoxia up-regulates  $\alpha 1\text{H}$  T-type channels and low threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol* 2007; 584:149-165.
  24. Smith CB, Eiden LE. Is PACAP the major neurotransmitter for stress transduction at the adrenomedullary synapse? *J Mol Neurosci* 2012; 48: 403-12.
  25. Carabelli V, Giaccipoli A, Baldelli P, et al. Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys J* 2003; 85: 1326-37.
  26. Lovell PV, McCobb DP. Pituitary control of BK potassium channel function and intrinsic firing properties of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 2001; 21: 3429-42.
  27. Chatterjee OI, Taylor LA, Ahmed S, et al. Social stress alters expression of large conductance calcium-activated potassium channel subunits in mouse adrenal medulla and pituitary glands. *J Neuroendocrinol* 2009; 2: 167-76.
  28. Duncan RR, Greaves J, Wiegand, UK, et al. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 2003; 422: 176-80.
  29. Estévez-Herrera J, Domínguez N, Pardo MR, et al. ATP: The crucial component of secretory vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: E4098-106.
  30. Stachowiak MK, Goc A, Hong JS, et al. Neural and hormonal regulation of the tyrosine hydroxylase gene in adrenal medullary cells: Participation of c-fos and AP1 factors. *Mol Cell Neurosci* 1990; 1: 202-13.
  31. Zigmond RE, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* 1989;12: 415-61
  32. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci* 2001; 24: 91-8.
  33. Dunkley PR, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. *J Neurochem* 2019; 149: 706-728.
  34. Kvetnansky R, Weise VK, Kopin IJ. Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology* 1970; 87: 744-9.
  35. Mishra RR, Adhikary G, Simonson MS, et al. Role of c-fos in hypoxia-induced AP-1 cis-element activity and tyrosine hydroxylase gene expression. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 59: 74-83.
  36. Rusnák M, Jeloková J, Vietor I, et al. Different effects of insulin and 2-deoxy-D-glucose administration on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus and the adrenal medulla in rats. *Brain Res Bull* 1998; 46: 447-52.
  37. Udenfriend S, Zalzman-Nirenberg P, et al. Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase. *Biochem Pharmacol* 1965; 14: 837-845.
  38. Quinsey NS, Lenaghan CM, Dickson PW. Identification of Gln313 and Pro327 as residues critical for substrate inhibition in tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 1996; 66: 908-14.
  39. Kvetnansky R, Micutkova L, Kubovcakova L, et al. Localization and regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in the heart of rats and mice during stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018:405-17.
  40. Wong DL. Epinephrine biosynthesis: hormonal and neural control during stress. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 891-900.
  41. Tai TC, Wong DL. Protein kinase A and protein kinase C signaling pathway interaction in phenylethanolamine N-methyltransferase gene regulation. *J Neurochem* 2003; 85: 816-29.
  42. Wong DL, Tai TC. Neural mechanisms regulating phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression. En: Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, Goldstein DS, Eds. *Catecholamine Research: From Molecular Insights to Clinical Medicine*. Kluwer Academic, New York, 2002; pp. 135-138.
  43. Tai TC, Claycomb R, Siddall BJ, et al. Stress-induced changes in epinephrine expression in the adrenal medulla in vivo. *J Neurochem* 2007; 101: 1108-18.
  44. Goldstein DS, Kopin IJ. Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathetic responses to stressors: a meta-analysis. *Endocr Regul* 2008; 42: 111-9.



45. Kvetnansky R, Micutkova L, Rychkova N, et al. Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic ganglia of stressed rats. *Ann N Y Acad Sci* 2004a; 1018: 356-69.
46. McCarty R, Horwatt K, Konarska M. Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc Sci Med* 1988; 26: 333-341.
47. Gavrilovic L, Spasojevic N, Tanic N, et al. Chronic isolation of adult rats decreases gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes in adrenal medulla. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29: 1015-1020.
48. Haavik J, Blau N, Thöny B. Mutations in human monoamine-related neurotransmitter pathway genes. *Hum Mutat* 2008; 29: 891-902.
49. Nagatsu T, Nagatsu I. Tyrosine hydroxylase (TH), its cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), other catecholamine-related enzymes, and their human genes in relation to the drug and gene therapies of Parkinson's disease (PD): historical overview and future prospects. *J Neural Transm (Vienna)* 2016; 123: 1255-1278.
50. Langer SZ. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 1980; 32(4): 337-62.
51. Artalejo AR, Olivos-Oré LA. Alpha2-adrenoceptors in adrenomedullary chromaffin cells: functional role and pathophysiological implications. *Pflugers Arch* 2018; 470: 61-66.
51. Starke K. Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors. *J Neurochem* 2001; 78: 685-93.
52. Kleppisch T, Ahnert-Hilger G, Gollasch M, et al. Inhibition of voltage-dependent Ca2+ channels via alpha 2-adrenergic and opioid receptors in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* 1992; 421:131-137.
53. Hernández-Guijo JM, Carabelli V, Gandía L, et al. Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 1999; 11:3574-584.
54. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 159-165
55. Schneider J, Lother A, Hein L, et al. Chronic cardiac pressure overload induces adrenal medulla hypertrophy and increased catecholamine synthesis. *Basic Res Cardiol* 2011; 106:591-602.
55. Schneider J, Lother A, Hein L, Gilsbach R. Chronic cardiac pressure overload induces adrenal medulla hypertrophy and increased catecholamine synthesis. *Basic Res Cardiol* 2011; 106: 591-602.
56. Jafferjee M, Reyes Valero T, et al. GRK2 up-regulation creates a positive feedback loop for catecholamine production in chromaffin cells. *Mol Endocrinol* 2016; 30: 372-381
57. Cannavo A, Liccardo D, Lympieropoulos A, et al. GRK2 Regulates  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptor-Dependent Catecholamine Release in Human Adrenal Chromaffin Cells. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: 1515-1517.
58. Lympieropoulos A, Rengo G, Funakoshi H, et al. Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med* 2007a; 13: 315-323.
59. Borges JI, Ferraino KE, Cora N, et al. Adrenal G Protein-Coupled Receptors and the Failing Heart: A Long-distance, Yet Intimate Affair. *J Cardiovasc Pharmacol* 2022; 80:386-392.
60. Lympieropoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation. *Trends Mol Med* 2007b; 13: 503-511.
61. Lympieropoulos A, Rengo G, Zincarelli C, et al. Modulation of adrenal catecholamine secretion by in vivo gene transfer and manipulation of G protein-coupled receptor kinase-2 activity. *Mol Ther* 2008; 16: 302-307.
62. Lympieropoulos A, Rengo G, Gao E, et al. Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction. *J Biol Chem* 2010; 285: 16378-16386.
63. Rengo G, Lympieropoulos A, Zincarelli C, et al. Blockade of beta-adrenoceptors restores the GRK2-mediated adrenal alpha(2)-adrenoceptor-catecholamine production axis in heart failure. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 2430-2440.
64. Fink EA, Xu J, Hübner H, et al. Structure-based discovery of nonopioid analgesics acting through the  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor. *Science* 2022; 377: 1509.
65. Grassi G, Mark A, Esler M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. *Circ Res* 2015;116: 976-90.
66. Floras JS. Epinephrine and the genesis of hypertension. *Hypertension* 1992; 19: 1-18.
67. Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, et al. Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension* 1989; 14: 177-83.
68. Yagil Y, Yagil C. Genetic models of hypertension in experimental animals. *Exp Nephrol* 2001; 9: 1-9.
69. Pintérová M, Kuneš J, Zicha J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol Res* 2011; 60: 381-402.
70. Judy WV, Farrell SK. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1979; 1: 605-614.
71. Lee RM, Trigg CR, Cheung DW, et al. Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987; 10: 328-338.
72. Korner P, Bobik A, Oddie C, et al. Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension* 1993; 22: 243-252.
73. Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, et al. Sympathectomy-induced blood pressure reduction in adult normotensive and hypertensive rats is counteracted by enhanced cardiovascular sensitivity to vasoconstrictors. *Hypertens Res* 2019; 42: 1872-1882.





74. Vlachakis ND, Alexander N, Maronde RF. Increased plasma normetanephrine in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1980; 2: 309-319.
75. Borkowski KR. Effect of adrenal demedullation and adrenaline on hypertension development and vascular reactivity in young spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 1991; 11: 1-14.
76. Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, et al. Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1991; 69: 714-721.
77. Vavřínová A, Behuliak M, Vaněčková I, et al. The abnormalities of adrenomedullary hormonal system in genetic hypertension: Their contribution to altered regulation of blood pressure. *Physiol Res* 2021; 70: 307-326.
78. Lim DY, Jang SJ, Park DG. Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol* 2002; 22: 225-232.
79. Moura E, Pinto CE, Caló A, et al.  $\alpha_2$ -Adrenoceptor-mediated inhibition of catecholamine release from the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats is preserved in the early stages of hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109: 253-60.
80. Miranda-Ferreira R, De Pascual R, De Diego AM, et al. Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 685-693.
81. Segura-Chama P, López-Bistrain P, Pérez-Armendáriz EM, et al. Enhanced  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 2015; 467: 2307-23.
82. Tabei R, Fujiwara T, Kondo M, et al. Morphological studies on the paraneuron in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1988;10 Suppl 1: 235-47.
83. Musial DC, Bomfim GH, Arranz-Tagarro JA, et al. Altered mitochondrial function, calcium signaling, and catecholamine release in chromaffin cells of diabetic and SHR rats. *Eur J Pharmacol* 2017; 815: 416-426.
84. Peña Del Castillo JG, Segura-Chama P, Rincón-Heredia R, et al. Development of the hypersecretory phenotype in the population of adrenal chromaffin cells from prehypertensive SHRs. *Pflugers Arch* 2021; 473: 1775-1793.
85. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, et al. Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 1994; 65: 367-369.
86. Reja V, Goodchild AK, Phillips JK, et al. Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auton Neurosci* 2002; 98: 79-84.
87. Moura E, Pinho Costa PM, et al. Decreased tyrosine hydroxylase activity in the adrenals of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2005; 76: 2953-2964.
88. Grundt A, Grundt C, Gorbey S, et al. Strain-dependent differences of restraint stress induced hypertension in WKY and SHR. *Physiol Behav* 2009; 97: 341-346.
89. Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, et al. Which sympathoadrenal abnormalities of adult spontaneously hypertensive rats can be traced to a prehypertensive stage? *Hypertens Res* 2019 42: 949-959.
90. Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Caricati-Neto A, et al. Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329: 231-40.
91. Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Smaili SS, et al. Greater cytosolic and mitochondrial calcium transients in adrenal medullary slices of hypertensive, compared with normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 636: 126-36.
92. Bomfim GHS, Méndez-López I, Fernández-Morales JC, et al. Electrophysiological properties and augmented catecholamine release from chromaffin cells of WKY and SHR rats contributing to the hypertension development elicited by chronic EtOH consumption. *Eur J Pharmacol* 2017; 803: 65-77.
93. Phaner MJ, Galligan JJ, Swain GM. Increased catecholamine secretion from single adrenal chromaffin cells in DOCA-salt hypertension is associated with potassium channel dysfunction. *ACS Chem Neurosci* 2013; 4: 1404-13.
94. Cohen SP, Vase L, Hooten, WM. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *Lancet*. 2021; 397: 2082-2097.
95. Chen J, Abbod M, Shieh, JS. Pain and Stress Detection Using Wearable Sensors and Devices-A Review. *Sensors (Basel)*; 2021; 21:1030.
96. Ferdousi M, Finn DP. Stress-induced modulation of pain: Role of the endogenous opioid system. *Prog Brain Res* 2018; 239: 121-177.
97. Caraci F, Merlo S, Drago F, et al. Rescue of Noradrenergic System as a Novel Pharmacological Strategy in the Treatment of Chronic Pain: Focus on Microglia Activation. *Front Pharmacol* 2019;10: 1024.
98. Imbe H, Iwai-Liao Y, Senba E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci* 2006; 11: 2179-92.
99. Jänig. Pain and the Sympathetic Nervous System: pathophysiological mechanisms. En: *Autonomic Failure: A Textbook of Clinical Disorders of the Autonomic Nervous System* (5 edn). Christopher J. Mathias (ed.), Sir Roger Bannister (ed.). Oxford University Press 2013; pg. 236- 246.
100. Taylor SS, Noor N, Urits I, et al. Complex Regional Pain Syndrome: A Comprehensive Review. *Pain Ther* 2021; 10: 875-892.





101. Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 1996; 113: 161-84.
102. Khasar SG, Miao JP, Jänig W, et al. Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 435-44.
103. Khasar SG, Miao FJ, Jänig W, et al. Vagotomy-induced enhancement of mechanical hyperalgesia in the rat is sympathoadrenal-mediated. *J Neurosci* 1998;18: 3043-9.
104. Jänig W, Khasar SG, Levine JD, et al. The role of vagal visceral afferents in the control of nociception. *Prog Brain Res* 2000 ;122: 273-87.
105. Khasar SG, Green PG, Levine JD. Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain* 2005; 116: 79-86.
106. Khasar SG, Burkham J, Dina OA, et al. Stress induces a switch of intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *J Neurosci* 2008; 28: 5721-30.
107. Khasar SG, Dina OA, Green PG, et al. Sound stress-induced long-term enhancement of mechanical hyperalgesia in rats is maintained by sympathoadrenal catecholamines. *J Pain*. 2009; 10: 1073-7.
108. Khasar SG, Green PG, Miao FJ, et al. Vagal modulation of nociception is mediated by adrenomedullary epinephrine in the rat. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 909-15.
109. Fraser CM, Venter JC. The synthesis of beta-adrenergic receptors in cultured human lung cells: induction by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 94: 390 -397.
110. Pavoiné C, Behforouz N, Gauthier C, et al. beta2-Adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 1117–1125.
111. Dina OA, Aley KO, Isenberg W, et al. Sex hormones regulate the contribution of PKCepsilon and PKA signalling in inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 2227-33.
112. Khasar SG, Dina OA, Green PG, et al. Estrogen regulates adrenal medullary function producing sexual dimorphism in nociceptive threshold and beta-adrenergic receptor-mediated hyperalgesia in the rat. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 3379-86.
113. Raddatz D, Bockemuhl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 547–557.
114. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 448–452
115. Wollstein R, Chaimsky G, Carlson L, et al. Evaluating short-term pain after steroid injection. *Am J Orthop* 2007; 36:128 -131.
116. Tchivileva IE, Hadgraft H, Lim PF, et al. Efficacy and safety of propranolol for treatment of temporomandibular disorder pain: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Pain* 2020; 161: 1755-1767.
117. Nakafero G, Grainge MJ, Valdes AM, et al.  $\beta$ -blocker prescription is associated with lower cumulative risk of knee osteoarthritis and knee pain consultations in primary care: a propensity score-matched cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2021; 60: 5686-5696.
118. Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988, 33, 87-107.
119. Arribas-Blázquez M, Olivos-Oré LA, Barahona MV, et al. Overexpression of P2X3 and P2X7 Receptors and TRPV1 Channels in Adrenomedullary Chromaffin Cells in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 155.
120. Arribas-Blázquez M, Olivos-Oré LA, Barahona MV, et al. The Adrenal Medulla Modulates Mechanical Allodynia in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 8325.
121. Rodríguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, et al. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* 1988; 51: 1696-703.
122. Castillo CJ, Moro MA, Del Valle M, et al. Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla. *J Neurochem* 1992; 59: 723-32.
123. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82:1013-67.
124. Salas E, Carrasquero LM, Olivos-Oré LA, et al. Purinergic P2X7 receptors mediate cell death in mouse cerebellar astrocytes in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 347: 802-15.
125. Ulate G, Scott SR, González J, et al. Extracellular ATP regulates exocytosis in inhibiting multiple  $Ca^{2+}$  channel types in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* 2000; 439: 304-14.
126. Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 487-517.
127. Wilson-Gerwing TD, Dmyterko MV, Zochodne DW, et al. Neurotrophin-3 suppresses thermal hyperalgesia associated with neuropathic pain and attenuates transient receptor potential vanilloid receptor-1 expression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 758-67.
128. Xiang Z, Xiong Y, Yan N, et al. Functional up-regulation of P2X 3 receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion. *Pain*. 2008; 140: 23-34.
129. Bao G, Metreveli N, Li R, Taylor A, et al. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *J Appl Physiol* 1997; 83: 95-101.

Si desea citar nuestro artículo:

**Adaptación de la médula adrenal al estrés: implicaciones fisiopatológicas**

Antonio Rodríguez Artalejo

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 513-527

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.18>



# INTEGRACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CON LA DOCENCIA. EXPERIENCIA DE UN DEPARTAMENTO UNIVERSITARIO

## INTEGRATION OF RESEARCH WITH TEACHING. EXPERIENCE OF AN UNIVERSITY DEPARTMENT

**Mercedes Salaices Sánchez**

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid. Teléfono 34914975378.

**corresponding author:** mercedes.salaices@uam.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

En este artículo se comentan aspectos generales de las funciones de la universidad y del trabajo del profesor universitario. Asimismo, se analizan los resultados de algunos artículos que han investigado la relación entre investigación y docencia. Se identifica tres posturas en esta relación. La primera afirma que la docencia y la investigación no están relacionadas; así, un profesor puede ser muy productivo en un aspecto sin ser necesariamente productivo en el otro. Una segunda postura sostiene que de hecho existe una relación de incompatibilidad entre ellas. La tercera sostiene que ambas se refuerzan mutuamente. En cualquier caso, actualmente hay amplio consenso en la conveniencia de acercar la investigación y la docencia en el trabajo de los profesores. Por último, se describen algunos ejemplos de cómo se ha integrado la investigación en la actividad docente de un departamento universitario. Se concluye que las relaciones entre investigación y docencia pueden aportar beneficios en el aprendizaje y la formación de los alumnos.

#### ABSTRACT

*This article discusses general aspects of the functions of the university and the work of the university professor. Likewise, the results of some articles that have investigated the relationship between research and teaching are analyzed. Three positions are identified in this relationship. The first affirms that teaching and research are not related; therefore, a teacher can be very productive in one aspect without necessarily being productive in the other. A second position maintains that in fact there is a relationship of incompatibility between them. The third maintains that both are mutually reinforcing. In any case, there is currently a broad consensus on the convenience of bringing research and teaching closer together in the work of professors. Finally, some examples of how research has been integrated into the teaching activity of a university department are described. It is concluded that the relationship between research and teaching can provide benefits in the learning and training of students.*

#### Palabras Clave:

universidad  
docencia  
investigación

#### Keywords:

university  
teaching  
research



## 1. INTRODUCCIÓN

En 1976 me entrevistaron para acceder al puesto de Profesor Ayudante en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). En una de las preguntas que me hicieron, me pidieron que formulara mi opinión acerca de la “integración de la investigación con la docencia en la universidad”. Admiraba a muchos de mis profesores universitarios y esa fue una de las razones principales por la que quería ser profesor, pero esa pregunta me desconcertó, ya que acababa de terminar mi licenciatura y no me había acercado todavía ni a la docencia ni a la investigación. De hecho, en aquel momento pensé *¿No son la investigación y la docencia actividades independientes?* Esa pregunta me ha seguido a lo largo de mi carrera y con frecuencia me vuelvo a preguntar cómo integrar la investigación con la docencia que imparto y si ello es beneficioso o no para la formación de nuestros alumnos. Los más de cuarenta años, que llevo haciendo investigación y docencia en la Universidad Autónoma de Madrid, han hecho que sea una fiel defensora de la importancia de la investigación para el buen trabajo docente del profesor universitario.

En este artículo se hará una revisión de aspectos generales de las funciones de la universidad y del profesor universitario, de algunos trabajos que han investigado la relación entre investigación y docencia y de mi propia experiencia, para lo que se citarán algunos ejemplos de cómo ha repercutido la investigación en la actividad docente del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UAM.

## 2. LA UNIVERSIDAD. CENTRO DOCENTE E INVESTIGADOR

La Carta Magna de Universidades (1), firmada por más de 80 universidades europeas en Bolonia en 1988, constituye la declaración más importante para entender las funciones de la Universidad. En uno de sus principios fundamentales se dice que *“Con el rechazo de la intolerancia y mediante el diálogo permanente, la universidad es un lugar de encuentro privilegiado entre profesores, que disponen de la capacidad de transmitir el saber y los medios para desarrollarlo a través de la investigación y de la innovación y estudiantes, que tienen el derecho, la voluntad y la capacidad de enriquecerse con ello”*.

Las universidades en todo el mundo son, por tanto, espacios formativos por excelencia, donde se capacita a los profesionales para ejercer su labor. Se podría decir que la Universidad tiene una misión única que es *“La mejora permanente de la sociedad a través del conocimiento”*. En nuestro país, la Ley Orgánica de Universidades (2) establece en su artículo 1 que *“La Universidad realiza el servicio público de la Educación Superior mediante la investigación, la*

*docencia y el estudio”*. Así, la investigación y la docencia son funciones básicas de la institución universitaria; la primera para la creación del conocimiento y la segunda para su disseminación. Una Universidad, si usamos con rigor el término, debería tener ambas responsabilidades como inseparables y tienen su razón de ser en el aprendizaje de los estudiantes y la formación de profesionales. De no ser así estaríamos hablando de otro tipo de organizaciones, aunque se dediquen a la Educación Superior, o de otros organismos, no universitarios, que atienden la función universitaria de investigación, como son los organismos públicos de investigación.

La actividad docente es quizá la más evidente para una universidad, pues a fin de cuentas éstas se crean para la enseñanza. Según el Anteproyecto de la Ley Orgánica del Sistema Universitario (LOSU) (3), que previsiblemente entrará en vigor en 2023, *“La docencia y la formación son funciones fundamentales de las universidades y deben entenderse como la transmisión ordenada del conocimiento científico, tecnológico, humanístico y artístico, y de las competencias y habilidades inherentes al mismo”*. Sin embargo, para promover el proceso de enseñanza las universidades tienen o deben apoyarse en el otro pilar fundamental, la investigación. Aparte de la cualificación profesional, la Universidad debe forjar en el individuo una actitud científica, que le acostumbre a valorar los hechos, a aceptar provisionalmente lo demostrado y a adoptar una actitud de sano escepticismo ante las afirmaciones sin fundamento. Considero que este aspecto de la educación universitaria solo puede llevarse a cabo si en la universidad se realiza investigación. Además, debería existir una interrelación entre la docencia y la investigación, que favorezca en última instancia el aprendizaje de los alumnos. Sin embargo, esta interrelación no siempre es estable, ni igual en todas las disciplinas y departamentos y, tanto en España como en el resto del mundo, hay universidades cuya actividad es fundamentalmente (o casi única) docente, lo que desvirtúa el papel de la institución universitaria, mientras que otras tienen un buen perfil investigador además del docente.

Para llevar a cabo sus funciones, las universidades se alían con múltiples instituciones investigadoras y docentes mediante Consorcios o Convenios con otros centros de investigación (Institutos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institutos de Investigación Sanitaria, Centro de Investigación Biomédica en Red, etc), con otras universidades nacionales o extranjeras, con centros sanitarios o con empresas, entre otras entidades, que favorecen y potencian dichas funciones. Ello se contempla expresamente en el Anteproyecto de la LOSU (3) en el que se indica que *“las universidades impulsarán la formación de redes de investigación entre grupos, departamentos, centros, instituciones, entidades y empresas”*. En el caso de las enseñanzas de Medicina o Enfermería, entre otros grados, no se puede olvidar el importantísimo papel que juegan



los convenios de las universidades con los hospitales en la formación de los futuros profesionales sanitarios.

La **docencia**, durante muchos años fue una actividad bastante individual de los profesores, si bien con los planteamientos derivados de nuestra pertenencia al espacio europeo de Educación Superior (EEES) y la declaración de Bolonia (de 2009 y fecha de implantación 2010), esto cambió. Un requisito fundamental para converger en el EEES ha sido el cambio de paradigma en el proceso enseñanza-aprendizaje, donde el objetivo formativo principal pasa a ser el *"aprendizaje del estudiante"* y dotar a los alumnos de la capacidad para *"seguir aprendiendo a lo largo de toda la vida"*. Así, deben desarrollar la capacidad para la obtención y empleo de la información más que el mero dominio de conocimientos. Por tanto, se trata de *"enseñar a aprender"*, para que el alumno tenga como fin primordial *"aprender a aprender"* inculcando así a los universitarios el concepto de *"aprendizaje de por vida"* (*lifelong learning*). Este modelo docente, con una concepción centrada en el alumno y en su proceso de aprendizaje, requiere también impulsar una mayor participación e implicación de los profesores, que deben cambiar sus roles, de enseñar lo que se sabe a ayudar a aprender, a trabajar en equipo y a colaborar con otros docentes. Para esta tarea va a ser importante la formación investigadora de los profesores. Sin embargo, el Plan Bolonia ha supuesto también un incremento considerable en las tareas administrativas, que lleva a que los profesores pasen con frecuencia más tiempo rellenando formularios y hojas excel y realizando y evaluando pruebas y revisiones, que las que tienen que dedicar a la preparación e impartición de sus clases.

La **investigación**, al igual que la docencia, es un derecho y un deber del personal docente e investigador (2, 3). Por tanto, trabajar en una universidad no es solo enseñar, sino que los profesores deben además realizar tareas investigadoras dentro de su área de conocimiento. La investigación universitaria es de importancia vital para la ciencia, la tecnología y la industria, independientemente del tipo de enseñanza que se lleven a cabo. Además, algunas de las infraestructuras que se consiguen a través de proyectos de investigación también se utilizan en actividades docentes. Por otra parte, la investigación permite a las universidades destacar por encima de otros centros, al posicionarse como generadoras de gran cantidad de investigaciones relevantes, aunque muchas veces solo se considera relevante la investigación que tiene un impacto inmediato en la sociedad. Lo cierto es que los límites entre la investigación básica y aplicada son cada vez mas borrosos y son necesarias ambos tipos de investigación para que la ciencia y la sociedad progrese, como ha podido demostrarse recientemente con la obtención rápida de vacunas contra la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2, gracias a la intensa investigación básica que se venía desarrollando desde hacía años en las universidades, entre

otras instituciones. En el caso de la investigación biomédica, ésta comienza con un problema de salud sin resolver, que requiere encontrar soluciones; se produce a continuación un periodo largo de investigación en el laboratorio, que lleva, en el mejor de los casos, a unos resultados y conclusiones que pueden tener una aplicación efectiva en el paciente. La solución del problema puede requerir la colaboración de bioquímicos, fisiólogos, farmacólogos, patólogos, morfólogos, genetistas, epidemiólogos, informáticos etc. Así, la investigación que se desarrolla en los departamentos o institutos de investigación universitarios es tarea de equipo y de colaboración entre instituciones; de hecho, los mejores proyectos suelen tener carácter internacional y cuentan con la participación de varias universidades e instituciones de investigación. Un ejemplo en España de colaboración entre instituciones es el Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER), con distintas áreas temáticas, que tiene como objetivo impulsar la investigación de excelencia en Biomedicina y Ciencias de la Salud que se realiza en el Sistema Nacional de Salud. En sus distintas áreas temáticas (CIBERER; CIBERCV...) participan grupos de investigación de distintas instituciones, entre ellas universidades, que colaboran para resolver problemas de salud (4). Por tanto, la investigación en la universidad también favorece las relaciones institucionales.

La plantilla docente de las universidades españolas lleva años comprometida, no solo con la docencia sino también con la investigación y todo aquel que quiera ser profesor de Universidad entiende la importancia de ésta última para mantener un perfil profesional acorde con las necesidades formativas actuales. Esto probablemente ha contribuido a que el sistema universitario español (SUE) haya ido mejorando su rendimiento global en docencia e investigación, aunque las diferencias entre universidades son notables, según el análisis de la evolución del SUE, incluido en el informe U-Ranking 2021, elaborado por la Fundación BBVA y el Instituto Valenciano de Investigación Económica (5). En otro informe, elaborado por la Conferencia de rectores de universidades españolas (CRUE) (6), se indica que, desde 2007 y hasta 2014, las universidades españolas registraron una importante mejora de su productividad científica, incrementándose el número total de artículos y la proporción de los que se publican en revistas científicas del primer cuartil. Sin embargo, a partir de 2015, la investigación de más alto nivel de calidad y excelencia comienza a retroceder o estabilizarse. Este resultado no debe de sorprender y es el que cabe esperar como consecuencia de la reducción de los recursos disponibles para I + D que se llevó a cabo durante la crisis de 2008 y que, tras la recuperación, no han retomado su nivel de partida, aunque ya se hayan recuperado los niveles de renta nacional previos. A pesar de la mejora en la productividad científica, solo 12 universidades españolas se encuentran entre las 500 primeras del mundo y sólo una entre las 200





primeras, según el ranking de Shanghai (Academic Ranking of World Universities, ARWU) (7). En el informe de la CRUE mencionado se dice que, *“España, difícilmente podría situar alguna más de sus universidades en el TOP 200 de ARWU ya que las universidades españolas desarrollan su actividad científica en un entorno de gasto que está entre la mitad y la cuarta parte de los países que sitúan a sus universidades en el TOP 200 de los rankings internacionales de referencia”*.

Desde hace años la investigación ha sido centro de interés para los responsables de la gestión universitaria, debido en buena parte a que brinda prestigio a la institución universitaria, al ser uno de los principales componentes de los rankings universitarios. Existen numerosos rankings que clasifican a las universidades y no existe un baremo único para medir la excelencia de estas instituciones, sino que cada uno establece su propio baremo. Sin embargo, hay una serie de parámetros que se suelen tener en cuenta. Entre ellos: 1) Las citaciones (número de veces que se citan los trabajos de investigación de sus profesores); 2) La reputación académica, que se suele calcular mediante encuestas a profesores sobre los méritos de las instituciones universitarias; 3) El número de profesores y otro personal en relación con el número de alumnos; 4) La internacionalización de profesores y estudiantes. Según estos baremos, las universidades con departamentos científicos fuertes y mucha colaboración internacional, tienen más probabilidades de alcanzar buenas posiciones. Sin embargo, estos rankings son cuestionados ya que en la mayoría de ellos no se tiene en cuenta la calidad formativa de los alumnos que sale de sus aulas.

El U-Ranking mencionado (5) analiza a las universidades españolas en función de 20 indicadores, diez para la evaluación de la actividad docente y otros diez para la investigadora e innovadora (Figura 1). Tanto en relación con la investigación e innovación como con la docencia se analizan indicadores relacionados con los recursos obtenidos, la producción, su calidad y la internacionalización. Uno de los resultados de este estudio muestra, que las universidades situadas en las primeras posiciones se mantienen en dichas posiciones independientemente de distintos pesos que se dé a la investigación y a la docencia, para el cálculo de la puntuación final (Figura 2). Ello indica que la calidad de la investigación y de la docencia pueden estar correlacionadas, al menos en las universidades que mejor quedan según este ranking; la mayoría de ellas aparecen también en el top 500, que incluyen los rankings internacionales más conocidos, como el ARWU, el QS World o el Times Higher Education (THE) (7, 8, 9). Sin embargo, para el total de universidades dicha relación no se mantiene, por lo que considerar los resultados de investigación como aproximación de los docentes puede no ser siempre adecuado. Concretamente, en el caso de algunas universidades privadas se diluye más la relación entre docencia e investigación debido a que estas instituciones combinan en muchos casos fortaleza docente y debilidad investigadora.

La investigación y la docencia no son las únicas responsabilidades de la Universidad para que pueda ejercer la función principal de mejora de la sociedad a través del conocimiento. Además, debe ejercer el servicio a la sociedad a través de múltiples tareas como la transferencia de dicho conocimiento, la creación y difusión

Investigación	Recursos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recursos públicos competitivos por profesor</li> <li>Contratos de doctores, becas de investigación y apoyo técnico sobre el presupuesto total</li> </ul>
	Producción	<ul style="list-style-type: none"> <li>Documentos citables con referencia ISI por profesor doctor</li> <li>Número de patentes por cien profesores doctores</li> <li>Tesis doctorales leídas por cada cien profesores</li> </ul>
	Calidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>Factor medio de impacto</li> <li>Porcentaje de publicaciones en primer cuartil</li> <li>Citas por documento</li> </ul>
	Internacionalización	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fondos de investigación europeos H2020 por profesor doctor</li> <li>Porcentaje de publicaciones con coautoría internacional</li> </ul>
Docencia	Recursos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Profesores por cada cien alumnos</li> <li>Porcentaje de profesores doctores</li> <li>Presupuesto por alumno</li> </ul>
	Producción	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tasa de éxito</li> <li>Tasa de evaluación</li> <li>Tasa de abandono</li> </ul>
	Calidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>Porcentaje de estudiantes de postgrado</li> <li>Notas de corte</li> </ul>
	Internacionalización	<ul style="list-style-type: none"> <li>Porcentaje de alumnos extranjeros</li> <li>Porcentaje de alumnos en programas de movilidad internacional</li> </ul>

Figura 1. Indicadores de investigación y de docencia de las universidades españolas, analizados en el U-Ranking 2021. Adaptado de “Indicadores sintéticos de las Universidades Españolas, U-Ranking 2021”, novena Edición (5).

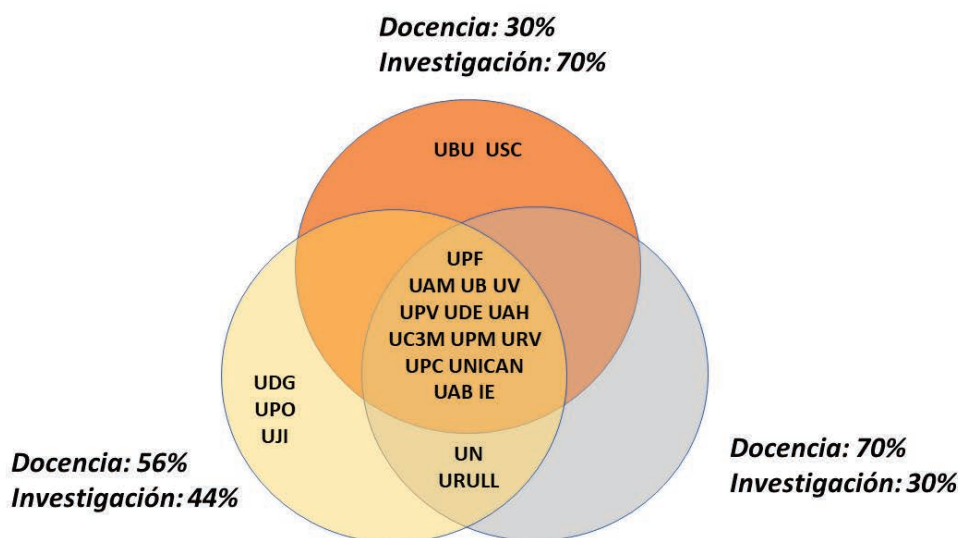


Figura 2. Efectos del cambio del peso de la investigación y la docencia en el U-Ranking sobre las universidades mejor clasificadas. Se incluyen las 16 primeras universidades en los casos de pesos de la investigación del 30% y 70% y las 19 primeras con peso del 44%. Adaptado de "Indicadores sintéticos de las Universidades Españolas, U-Ranking 2021", novena Edición (5).

de la cultura o la formación durante toda la vida profesional, entre otras. Estos pilares en los que se apoya la universidad, para ejercer su misión de mejora del conocimiento, no son entidades aisladas, sino que se entremezclan y se retroalimentan uno al otro y en muchas ocasiones algunas tareas de los profesores universitarios no se podrían identificar fácilmente en cuál de estos pilares estaría más implicado.

### 3. EL PROFESOR UNIVERSITARIO

El profesor universitario tiene un papel clave en las distintas actividades que se llevan a cabo en la Universidad y participa de forma importante en la atracción de talento y estudiantes a la misma. Esto es así porque él es el principal transmisor de conocimiento y con frecuencia, será mejor transmisor y guía para sus estudiantes si además es capaz de generarlo. Puede ser un referente social, ya que muchos estudiantes y profesionales toman como referentes o mentores a sus profesores, para llevar a cabo sus investigaciones y actividades profesionales y continuar así con la contribución a la *mejora de la sociedad a través del conocimiento*. Así, genera valor para la Universidad y es capaz de atraer a estudiantes y profesionales interesados en formarse y colaborar en su entorno académico-científico. Además, es embajador de la Universidad, tanto a nivel nacional como internacional; así, cuando impartimos conferencias o comunicaciones a congreso, cuando publicamos artículos o cuando impartimos cursos fuera de nuestro entorno, estamos representando a la universidad a la que pertenecemos.

Los profesores universitarios tienen que asumir múltiples y variadas tareas, algunas más relacionadas con la docencia, otras con la investigación, y otras con la gestión, tanto de la investigación como de la docencia, además de participar en muchas otras tareas relacionadas con la transferencia y la divulgación científica. El profesorado clínico además tiene que compatibilizar estas tareas con la asistencial, lo cual es de gran importancia para la adecuada formación de los futuros profesionales sanitarios. Con frecuencia los profesores universitarios nos preguntamos si es posible ser buen profesional en todas estas tareas o si se puede ser competitivo en todas ellas en una jornada laboral típica de 40 horas semanales. Max Weber (10) sugería que los buenos investigadores/docentes deberían dedicar igual cantidad de horas para ejercer eficientemente ambas actividades. En nuestro ambiente universitario con frecuencia se dice que un profesor universitario debería emplear un tercio de su tiempo en la docencia, un tercio en la investigación y un tercio en la gestión. Al menos para mí, a pesar de los muchos años dedicados a esta tarea, las clases magistrales, los seminarios y las prácticas, conllevan un gran número de horas de estudio dedicadas a su preparación y actualización (que al menos en mi campo es muy necesario); además, hay que atender a los alumnos y evaluarlos. Por su parte, realizar investigación implica dedicar mucho tiempo a la planificación, la obtención de resultados, la dirección de Tesis, la escritura de manuscritos para su publicación en revistas científicas y de divulgación científica, la asistencia a congresos... Además, lograr financiación para los proyectos, así como la justificación de dicha financiación, cuando finalmente se obtiene, conlleva un trabajo ímprobo. Finalmente las tareas de gestión de la docencia (re-



niones de departamento, coordinación de asignaturas, etc.), la participación en comisiones diversas y tribunales, tanto dentro como fuera de la universidad, la evaluación de trabajos o proyectos de investigación de colegas o las tareas de asesoramiento implican también una buena dosis de tiempo y energía, que se incrementa considerablemente si además se desempeña algún cargo académico (vicerrector, decano, vicedecano, director de departamento...). Por tanto, si quisiéramos ser buenos en todas estas actividades, la dedicación horaria semanal puede ser muy larga y contrasta con las políticas actuales de conciliación de la vida laboral y personal. A veces me pregunto, como los jóvenes profesores, recién graduados o con un reciente doctorado, que ahora se contratan en muchas universidades para impartir un número elevado de créditos anuales, pueden al mismo tiempo desarrollar una buena actividad investigadora, tan necesaria, a mi modo de ver para ser un buen profesor universitario.

### 3.1. ¿Cómo conciliar la tarea de investigación con las de docencia y gestión?

La gran mayoría de los profesores universitarios están al día de los avances científicos del área de la disciplina que imparten, aunque lo deseable es que además contribuyan a dicho avance científico con la producción de su propia investigación. Por ello, es necesario buscar estrategias que permitan conciliar una investigación seria y rigurosa con las múltiples tareas de docencia y gestión. Algunas de las que utilizan muchos profesores universitarios para esta conciliación, incluyen la concentración de la docencia en un semestre y la búsqueda de relaciones y sinergias entre la investigación y la docencia. Algunas universidades premian la productividad investigadora con descargas docentes o años sabáticos. Sin embargo, en muchas universidades hay profesores que casi sólo enseñan y otros que casi sólo investigan, hay universidades en las que la gran mayoría de sus profesores sólo enseñan y, en otras, a menudo se delegan las tareas docentes en profesores jóvenes, incluso recién licenciados, o en profesores menos activos en tareas investigadoras.

En las encuestas de los alumnos algunas veces se quejan de que *"muchos profesores consideran un fastidio salir de sus laboratorios de investigación para venir a dar sus clases"*; ello hace mucho daño a la imagen del profesor universitario. Considero que se debería asegurar la participación de los mejores investigadores en la docencia, sobre todo en los primeros cursos. En abril de 2001 se publicó una entrevista al premio nobel de física Carl Weiman (11). En relación con su actividad como profesor en la Universidad de Stanford le preguntaban: *"Usted está en la Universidad de Stanford (EEUU). ¿Se dedica sólo a investigar o también enseña?"* Su respuesta fue: *"Enseño, y más de lo que me exigen. En mi carrera como investigador no puedo ir mucho más allá, y en cambio en la*

*enseñanza queda muchísimo por hacer. En general en la universidad se transmite muy mal a los estudiantes porqué la física es interesante. Si se les enseña física de cosas interesantes en los primeros años... Yo lo primero que enseño es cómo funciona un microondas. Es mucho más atractivo, lo ven todos los días"*.

Desde hace años, Carl Weiman está enfocado en investigar, a través del método científico, si la formación universitaria de ciencia, en concreto de física, es eficaz o no. Por este motivo en 2018 vino a Madrid, invitado por la Fundación Ramón Areces, la Universidad Autónoma de Madrid y la Real Sociedad Española de Física, para impartir conferencias sobre cómo adoptar un enfoque científico a la enseñanza de ciencia (12, 13). En la conferencia que impartió en la UAM, a propósito de los Actos del 50 aniversario de esta Universidad, incidió en la necesidad de adoptar un enfoque científico a la enseñanza; decía que *"Pensar como un científico es un objetivo de la enseñanza y una necesidad educativa en la sociedad moderna"*. Sus ideas, implican enseñar a los alumnos, a través de la práctica, a pensar como científicos, a trabajar en equipo, a tomar decisiones y a usar el pensamiento crítico. Todo ello para responder a una pregunta que él mismo se hacía cuando comenzó su carrera profesional: *"¿Por qué los estudiantes de posgrado pueden alcanzar un gran éxito en muchos años de cursos de física, pero llegan al laboratorio y no pueden hacer física?"*. Este científico también considera, que actualmente la enseñanza de ciencia en la Universidad está anticuada. Weiman comenta *"En la actividad científica, es normal establecer hipótesis, contrastarlas con el experimento y analizarlas críticamente. Pero en la actividad docente a menudo se hace lo mismo que hacían nuestros antecesores"*.

### 3.2. Contradicciones en la política de profesorado

Existen muchas contradicciones en la política de profesorado de las universidades. Algunas de ellas se indican a continuación:

No existe ningún tipo de política o mecanismo para valorar hasta qué punto un profesor universitario vincula su actividad de investigación a la docente. Por otra parte, el sistema de evaluación del profesorado permite que la tarea docente e investigadora avancen y se desarrollen en paralelo. La evaluación de la investigación se hace fundamentalmente en función de los logros en publicaciones, patentes y proyectos. Además, en el Anteproyecto de LOSU (3) se indica que *"La interdisciplinariedad o multidisciplinariedad en la investigación constituirá un mérito en la evaluación de la actividad del personal docente e investigador"*. En el caso de la docencia, casi el único parámetro para la evaluación son las encuestas de los alumnos. En relación con ello, Carl Weiman opina que *"... la forma de evaluar el trabajo de los profesores es completamente defectuosa. Las opiniones de los estudiantes no tienen ningún valor, no te dicen cuánto están aprendiendo o lo implicados que están en la materia"* (13).

La política de profesorado de las universidades se diseña en función de las necesidades docentes mientras que los logros en investigación se valoran más que los aspectos docentes a la hora de seleccionar el profesorado. Las exigencias de las agencias de evaluación del profesorado, como la ANECA, se basan en buena medida en las publicaciones en determinadas revistas científicas. Así, los profesores jóvenes aprenden rápido, que para conseguir progresar en su carrera profesional tienen que dedicar mucho tiempo a investigar, por lo que intentan evadirse de la docencia. Así opina Weiman a este respecto: *“Los ascensos y los salarios de los profesores dependen en gran medida de su productividad científica. Así que decirle a uno que debe formarse durante 50 horas para mejorar su método de enseñanza, y que no van a poder invertir ese tiempo en un nuevo artículo científico, es como una penalización”* (13).

La igualdad de trato, que se ejerce en muchas universidades españolas, en la distribución de créditos de docencia entre todo el profesorado, independientemente de su actividad investigadora, sitúa a los investigadores en una situación de desventaja. Para este colectivo, además del prestigio que les puede proporcionar su tarea, la única compensación institucional consiste en presentarse cada seis años a una evaluación de su actividad investigadora (se-xenio), que le reportará un pequeño complemento a su sueldo.

De forma general, las universidades españolas no apoyan suficientemente a los profesores con personal que ayude con el exceso de tareas administrativas, de gestión y burocracia, que actualmente están realizando. Ello además es antieconómico, pues se pagan sueldos de profesor titular o catedrático por realizar, en buena parte, tareas que debería hacer un administrativo.

#### **4. RELACIÓN ENTRE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN LA UNIVERSIDAD**

Desde hace años se estudia si la investigación, que se realiza en las universidades, influye en la calidad de la docencia que se imparte y, sobre ello, se han escrito excelentes artículos y revisiones (14-19). A menudo se piensa que la docencia y la investigación están altamente correlacionadas; sin embargo, ésta es una hipótesis no siempre contrastada, probablemente debido a la falta de buenos indicadores de resultados docentes, además de por otras limitaciones, como la diversidad en la población estudiada y en los métodos utilizados en las investigaciones que estudian esta relación (20).

Se pueden identificar tres posturas con respecto a la relación entre investigación y docencia universitaria a nivel de pregrado puesto que en el posgrado la relación es indudable. La primera afirma que **la docencia y la investigación no están relacionadas**; por lo tanto, un profesor puede ser muy productivo en un aspecto sin ser necesariamente productivo en el otro. Una segunda postura sos-

tiene que, de hecho **existe una relación de incompatibilidad** entre ellas, ya que ambas actividades compiten por el tiempo, recursos y energía con que cuenta el profesorado para hacer su trabajo. La tercera postura sostiene que **ambas se refuerzan mutuamente** y, de acuerdo con ello, el profesorado puede ser muy productivo en ambas actividades. En cualquier caso, actualmente hay amplio consenso en la conveniencia de acercar la investigación y la docencia en el trabajo de los profesores. Los principales argumentos que sostienen cada una de estas posturas se indican a continuación.

##### **4.1. Docencia e investigación son actividades independientes**

Diversos estudios sugieren que no hay una relación significativa entre investigación y docencia. Así, algunos autores indican que la creencia de que la productividad investigadora aumenta el rendimiento docente se basa en la tradición universitaria, ya que no hay evidencia de asociación entre alta producción científica y eficacia docente (21-23), aunque como resultado de los análisis realizados tampoco se encuentra conflicto entre ambas actividades de los profesores universitarios. Feldman (24) concluye de sus estudios, que la probabilidad de que la productividad científica realmente favorezca la docencia es extremadamente pequeña. Por otro lado, en un metaanálisis en el que se analizaron 58 estudios y 500 correlaciones no se encontró relación entre investigación y docencia (25) y concluyen que los buenos investigadores solo tienen unas pocas más de probabilidades de ser buenos docentes que los no investigadores. Estos estudios ponen en entredicho la política de presionar al profesorado para desarrollar más investigaciones sobre el supuesto que ello va a mejorar la docencia.

##### **4.2. Docencia e investigación son incompatibles**

Otra posibilidad de relación entre docencia e investigación es incompatibilidad entre ambas actividades del profesorado universitario. Se argumenta que una buena docencia obliga a dedicar tanto tiempo a los alumnos que es imposible disponer del tiempo y de la energía que la investigación de calidad necesita. Por otra parte, la investigación exige moverse en unos esquemas intelectuales distintos de los de los alumnos, con quienes, por consiguiente, no se conectaría en la enseñanza. Varios autores han sugerido que el rendimiento insatisfactorio en la docencia podría deberse a que el profesorado descuida su responsabilidad docente con la finalidad de dedicarse a la investigación y a su difusión en publicaciones. En un estudio realizado con estudiantes de diversas disciplinas, estos perciben como beneficios de la investigación el entusiasmo del profesor y su credibilidad, pero también señalaron que la participación del profesorado en la investigación hace, que éstos tengan menor disponibilidad para los estudiantes y, además, no se perciben a sí mis-





mos como partes interesadas en la investigación (26). Otro inconveniente puede ser la distorsión del curriculum, si el profesor restringe su docencia a aquello que está investigando.

### 4.3. Docencia e investigación se refuerzan mutuamente

En 1983 ya Centra (27) decía que muchos buenos profesores son también buenos investigadores y Terenzine (28), en 1999, afirmaba que los académicos han de investigar para ser buenos profesores, ya que su actividad investigadora les permite un conocimiento actualizado de su disciplina y les posibilita traspasar su entusiasmo por aprender a los estudiantes. Así, la investigación puede influir en la enseñanza cuando el entusiasmo por la investigación se comunica a los estudiantes, que son capaces de ver el conocimiento como algo en constante crecimiento. Por otra parte, las discusiones con los alumnos pueden ayudar a formular nuevas hipótesis investigadoras y la investigación puede ayudar a mantener el interés del profesor en el tema, que además enseña. Además, docencia e investigación tienen en común el acto de aprender y confluyen en el incremento de conocimiento de la materia que se estudia y se enseña (29). Tesouro y colaboradores (30) desarrollaron una investigación con 259 profesores de la Universidad de Girona, con amplia actividad docente e investigadora, y llegaron a la conclusión que cuanto mayor es la eficacia como investigador más fuerte es la convicción de que la investigación guía la enseñanza. Además, a partir de técnicas de regresión se ha determinado que la actividad investigadora se relaciona significativamente con la eficacia docente (31). De forma similar y, como ya se ha mencionado, algunos resultados del U-Ranking (5) indican que la calidad de la investigación y de la docencia pueden estar relacionadas, al menos en las universidades que mejor puntuación alcanzan según este estudio.

La relación entre investigación y docencia puede ser **bidireccional**. Así, aunque la mayoría de las veces se nos pide a los investigadores que pensemos cómo se puede integrar la investigación con la docencia que impartimos, la actividad docente *también puede repercutir en una mejor investigación* debido a que:

Para crear nuevos conocimientos en una determinada área temática primero debemos dominar los existentes. Enseñar una materia es una de las formas más eficientes de adquirir dichos conocimientos.

En el proceso de explicar un fenómeno existente, podemos descubrir que las explicaciones o teorías existentes no son suficientes y nos puede dar ideas de cómo el conocimiento existente podría ampliarse o enmendarse. Cuando intentamos explicar varios hechos o situaciones a los estudiantes, a veces encontramos que no *podemos* explicar por qué las cosas son de cierta manera y siempre existe la posibilidad de que las preguntas que surjan en clase inspiren nuevas direcciones para nuestra investigación. Los estudiantes universitarios, a veces pueden hacer nuevas conexiones, que pueden llevar a ideas diferentes al conocimiento convencional.

Enseñar nos anima a pensar sobre el estado general de conocimiento y en lo que “realmente importa” de nuestra investigación en particular. En los seminarios con estudiantes a veces planteo temas de investigación novedosos de mi área de investigación, lo cual es una forma eficiente de profundizar y discutir con ellos acerca de un tema que repercute en mi propia investigación. Otras veces, la docencia permite que surjan ideas; así en los seminarios de la asignatura “Introducción a la Investigación Biomédica”, mientras discutía con los estudiantes sobre algunas técnicas necesarias para estudiar la participación de determinadas vías intracelulares en la patología que estábamos estudiando, me di cuenta que dichas técnicas podrían aplicarse a mi propia investigación, lo que proporcionó un gran avance en un problema que habíamos tenido en mi grupo durante años.

Tanto la enseñanza como la investigación tratan de comunicar ideas. No importa cuán importante sea nuestro descubrimiento de investigación si no podemos transmitir su importancia a los demás; en la enseñanza perfeccionamos esa habilidad. Por tanto, invertir tiempo y esfuerzo en el aula también nos puede ayudar a ser mejores investigadores.

### 4.4 ¿Cómo acercar docencia e investigación?

Si consideramos que existe una relación positiva entre la investigación y la docencia es necesario buscar fórmulas para poder conciliar una tarea de investigación seria y rigurosa con las múltiples tareas de docencia. Estas fórmulas pasan por la intersección entre los tiempos dedicados a la investigación y a la docencia. Entre otras actividades esta conciliación puede llevarse cabo:

1. Generando entusiasmo en el aula al incorporar la investigación más reciente sobre un tema específico en las clases o seminarios.
2. Implicando a los estudiantes en nuestros proyectos de investigación y que su actividad en estos proyectos cumpla la doble función de actividad investigadora a la vez que actividad docente.
3. Diseñando actividades de aprendizaje en torno a prioridades de investigación.
4. Incorporamos distintos aspectos del método científico en nuestra docencia.
5. Planteando problemas e interrogantes que busque activar los procesos cognitivos del estudiante, lo que fomentará su capacidad investigadora.
6. Diseñando proyectos de investigación a realizar por estudiantes individuales o en grupo.

Los profesores tenemos que pensar que existen diversas posibilidades a utilizar para conectar nuestra enseñanza con la investigación y viceversa. Al hacerlo, no solo se mejorará el aprendi-





zaje y participación de los estudiantes sino también nuestra propia investigación. Relacionando la lógica de la ciencia con la de la asignatura, se puede enseñar al estudiante a aprender y a aplicar los conocimientos, desarrollando al mismo tiempo su pensamiento crítico. Por su parte, las colaboraciones con estudiantes pueden llevarnos a nuevas ideas de investigación.

## 5. EJEMPLOS DE INTEGRACIÓN DE LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA CON LA DOCENTE EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UAM

Desde su creación en 1968, el objetivo de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid ha sido formar a los futuros profesionales con una disposición abierta para incorporar los nuevos conocimientos que no cesan de incorporarse a la Medicina. Para ello, era necesario desarrollar estrategias para fortalecer la capacidad investigadora del estudiante, incorporando la investigación científica en el proceso docente. Relacionando la lógica de la ciencia con la de la asignatura, se puede enseñar al estudiante a aprender y a aplicar los conocimientos, desarrollando al mismo tiempo su independencia cognoscitiva y su pensamiento crítico. Para lograr este objetivo, a lo largo de mi actividad académica, he participado en diversas actividades desarrolladas en mi Facultad para acercar la investigación a la enseñanza. La alta implicación del profesorado de esta Facultad en actividades de investigación ha facilitado esta tarea. Me referiré a algunos ejemplos en asignaturas de licenciatura o Grado en Medicina; es obvio como se hace esta integración en cursos de posgrado.

### 5.1. Prácticas en los laboratorios de investigación

En las primeras etapas que viví como profesor del Departamento de Farmacología la UAM, se invitaba a los alumnos a que colaboraran con las tareas de investigación del departamento, mediante la realización de prácticas voluntarias durante los meses de verano en los laboratorios de investigación de la Facultad. A pocos se les ocurría entonces pensar, en los años 70, que un estudiante de medicina prefiriera trabajar en un laboratorio durante los meses de verano, en vez de disfrutar de sus vacaciones y más teniendo en cuenta que las horas dedicadas a las mismas no les iba a repercutir en sus notas. Sin embargo, era raro el verano que no recibíamos a algún alumno interesado. Posteriormente, se diseñaron en nuestra Facultad asignaturas específicas para esta actividad. Así, en los años 90 con la implantación de nuevos planes de estudio de la Licenciatura de Medicina de la UAM, estas prácticas voluntarias se convirtieron en la asignatura optativa, "*Iniciación a la Metodología Científica en Medicina*", de 22 créditos, a realizar también en los meses de verano en los distintos grupos de la Facultad. Así, durante

muchos cursos tuvimos la fortuna de recibir cada verano a estudiantes de medicina que colaboraban en nuestros proyectos de investigación.

No nos hacíamos ilusiones que el trabajo que hacían los estudiantes en estas prácticas de verano fuera lo suficientemente importante para llegar a ser coautores de publicaciones relacionadas con la actividad investigadora. Sin embargo, algunos de los estudiantes que empezaron haciendo estas prácticas en nuestros laboratorios, decidieron prolongarlas a lo largo del siguiente curso y posteriores, lo que les permitió obtener una formación y un currículum investigador importante al acabar la carrera. Además, algunos de ellos decidieron seguir la carrera académica y acabaron convirtiéndose en profesores de Farmacología o de otras disciplinas en distintas facultades, siendo actualmente excelentes docentes e investigadores. Otros de estos alumnos se incorporaron a la Industria Farmacéutica y la gran mayoría siguieron la vía clínica especializándose en diferentes áreas. En todos los casos, los alumnos que pasaron por nuestros laboratorios aprendieron a investigar haciendo investigación, algo que constato les ha sido muy útil en su ejercicio profesional. Aprendieron lo que es verdaderamente el método científico, como la mejor herramienta para desarrollar una actitud crítica y para favorecer la toma de decisiones ante un determinado problema médico. Además, el paso de estos estudiantes por nuestros laboratorios mejoró nuestra investigación, no solo por los resultados que obtuvieron al desarrollar los protocolos experimentales que les adjudicábamos, sino porque en muchas ocasiones sus mentes frescas y no contaminadas nos aportaron puntos de vista e ideas novedosas que, a los profesores enfrascados en nuestras hipótesis convencionales, se nos escapaban.

### 5.2. Minicongreso de Estudiantes

Otra actividad docente que iniciamos en los años 70 fue el Minicongreso de Farmacología y Terapéutica, cuya primera edición se realizó en 1977 y que hasta el curso 2012-13 formó parte de la docencia de la asignatura de Farmacología General, en el Tercer curso de la Licenciatura de Medicina. El objetivo general de esta actividad docente era fomentar la investigación de los pre-licenciados universitarios en el ámbito de la salud, haciendo énfasis en el adecuado uso del método científico, como la mejor herramienta para desarrollar una actitud crítica y para la toma de decisiones. Además, queríamos motivar el interés de los futuros clínicos por la investigación básica como fuente de revisión y mejora constante de la práctica médica diaria.

Esta actividad tuvo un extraordinario éxito y fue muy apreciada por los alumnos de Medicina, que a lo largo del curso realizaban un trabajo de investigación experimental, clínico o epidemiológico, asesorados por un profesor; trabajo que era pos-

teriormente expuesto por ellos mismos en una jornada a la que se concedía un pleno formato de congreso científico. La idea de exponer públicamente los resultados de la investigación sobre un tema de laboratorio, una revisión bibliográfica, un estudio basado en tratamientos farmacológicos, revisando historias clínicas de pacientes, o haciendo una encuesta de opinión sobre el uso de los medicamentos, sirvió de acicate para que los alumnos tomaran como propias todas las actividades que, a lo largo del curso, se coronarían con la celebración del Minicongreso. Año tras año, fue adquiriendo la estructura de cualquier congreso médico y tuvo la virtud de ilusionar a alumnos y profesores. Era emocionante ver a los alumnos participar en los debates y compartir con ellos el trabajo científico, en una fantástica relación alumno/profesor, que se cultivaba a lo largo del curso, en las reuniones que los profesores celebrábamos con los alumnos para orientar y seguir la evolución de su trabajo. Con los años, acudirían al Minicongreso estudiantes y profesores de otras universidades, concretamente de Salamanca, Córdoba, Alcalá de Henares, Complutense de Madrid, Valencia y Santander. Hubo ediciones en las que nos dimos cita más de 300 alumnos y profesores. En años sucesivos, los Minicongresos de estudiantes de medicina se extendieron a otras universidades españolas y extranjeras.

Con la actual implantación de los estudios de Grado, el Minicongreso se ha integrado dentro de la asignatura "Introducción a la Investigación Biomédica", donde se sigue organizando esta actividad (ver más abajo). Es curioso el hecho de que el Minicongreso de Farmacología de los estudiantes de la UAM se adelantara tres décadas a los acuerdos de Bolonia para avanzar en el Espacio Europeo de Educación Superior: menos clases teóricas y más actividades en grupo. En esos años 70 pensábamos que en educación médica

uno de los aspectos que debíamos cuidar era crear un ambiente propicio para que los futuros médicos desarrollaran una actitud crítica ante el ya cúmulo de información que tenía a su alrededor y que nos empeñábamos en proporcionarles.

### 5.3 Seminarios de Farmacología

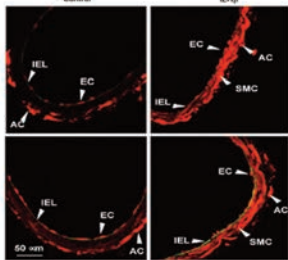
Con la implantación en la UAM (2010-2011) de los nuevos planes de estudio, de acuerdo con las especificaciones del Espacio Europeo de Educación Superior, nos dimos cuenta de que nuestra experiencia en investigación podía ser muy útil para tratar de que los alumnos adquirieran las competencias en investigación, que se les exige obtengan en los distintos grados. Así, actualmente dentro de las competencias de los diferentes grados, y concretamente del grado de Medicina en la UAM (32) se encuentran varias relacionadas con la formación investigadora como son: "CG36 - Ser capaz de formular hipótesis, recolectar y valorar de forma crítica la información para la resolución de problemas, siguiendo el método científico", "CG37 - Adquirir la formación básica para la actividad investigadora", "CT9. - Capacidad de comunicar información científica de manera clara y eficaz, incluyendo la capacidad de presentar un trabajo, de forma oral y escrita, a una audiencia profesional y la de entender el lenguaje y propuestas de otros especialistas", etc. En nuestra Facultad hay asignaturas específicamente diseñadas para que adquirieran estas competencias. pero tratamos de que las obtengan también al cursar la mayoría de las asignaturas.

En el caso de la Farmacología general I y II, que se imparte en tercer curso, aproximadamente la mitad de los créditos de estas asignaturas se imparte en forma de 22 seminarios que complementan la información proporcionada en las clases teóricas. Se utilizan

Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología

**SEMINARIO PRÁCTICO Nº 12-FG1**  
**FARMACOLOGÍA DEL DOLOR Y LA INFLAMACIÓN**

**2. Inflamación vascular y localización de ciclooxigenasa 2 (COX-2) en la pared vascular.**  
A continuación se muestran unas microfotografías tomadas de un trabajo de Briones et al. (Mech Ageing Dev. 2005, 126:710-21) en las que se observa la expresión de COX-2 en secciones transversales de arterias mesentéricas de rata expuestas o no a la citoquina IL-1 $\beta$ . Los paneles de arriba corresponden a arterias de animales jóvenes y los de abajo a arterias de animales viejos



**Cuestiones:**

2.1 ¿Qué método emplearon en este trabajo para detectar la proteína COX-2 en la pared vascular?

2.2 ¿Por qué cree que los autores se plantearon estudiar la expresión vascular de COX-2 en animales jóvenes y viejos?

2.3 ¿En qué tipo celular de la pared vascular se encuentra expresada la COX-2 en situación basal (paneles de la izquierda)? ¿Qué prostanoideos cree que se producirían en estas células? ¿qué función fisiológica tendrían a este nivel?

2.4 ¿Qué pasa con la expresión de la COX-2 cuando la pared vascular se expone a la citoquina (paneles de la derecha)? ¿a qué situación patológica podría equivaler?

2.5 ¿Qué consecuencias tendría la inhibición de la COX-2 en las células endoteliales?

2.6 ¿Qué consecuencias tendría si lo que se inhibe es la COX-1 de las plaquetas?

2.7 ¿Qué efectos ocasionaría un fármaco que solo inhibiera la COX-1 de las plaquetas? ¿y si el fármaco sólo inhibiera la COX-2 de las células endoteliales.

Fig. 3. Representative photomicrographs of COX-2 immunofluorescence in transverse sections of mesenteric arteries from young (upper panels) and old (lower panels) Sprague-Dawley rats incubated (1 h) in the absence (Control) or presence of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml). COX-2 was labelled with a secondary antibody conjugated with Cy3 and appeared red. Nuclear counterstaining of the stained slices (hematoxylin) appears green and a very insoluble collagen and media layer. AC: adventitial cells; EC: endothelial cells; SMC: smooth muscle cells; IEL: intimal elastic lamina. n = 8 animals.

Figura 3. Ejemplo de algunos de los planteamientos y preguntas que se les formulan a los alumnos en uno de los Seminarios de la asignatura "Farmacología I" del Grado de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología

SEMINARIO PRÁCTICO Nº 3-FG2  
FARMACOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN

1.- Un problema relacionado con el veneno de serpiente.

En 1949, el farmacólogo brasileño Mauricio Rocha e Silva descubrió que la inyección en la circulación de mamíferos del veneno de la serpiente "jararacá" (*Bothrops jararaca*) aumentaba los niveles del péptido vasodilatador bradiquinina. Unos años después, en la primera mitad de los años sesenta del pasado siglo veinte, su discípulo Sergio H. Ferreira publicó un trabajo analizando la naturaleza y los efectos de un extracto purificado de este veneno que denominaba como Bradykinin-Potentiating Factor (BPF) (SH Ferreira: *A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Bothrops jararaca*. Br J Pharmacol 24: 163-169, 1965).

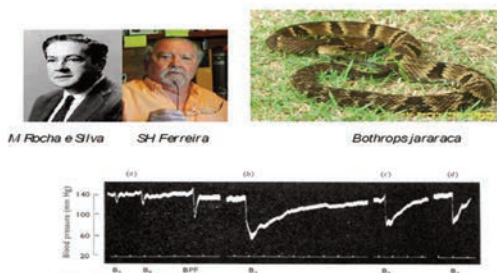


Fig. 4. The effect of bradykinin potentiating factor (BPF) upon the arterial hypotension produced in a cat by bradykinin. (a) Before; (b), (c) and (d) 1, 15 and 30 min after 2 mg/kg of BPF. B<sub>1</sub>, 1 µg/kg and B<sub>2</sub>, 2 µg/kg of synthetic bradykinin. Drugs were injected intravenously. Time marks, 1 min.

Cuestiones.-

- 1.1. Indique las condiciones experimentales de este experimento.
- 1.2. ¿A qué se debía la potenciación de los efectos de la bradiquinina? ¿Qué enzima estaba afectada? ¿Dónde se localiza preferentemente?
- 1.3. ¿Tiene alguna relación esta enzima con el sistema renina-angiotensina? ¿Cuál?
- 1.4. El BPF aislado del veneno de *B. jararaca* era un péptido. Basándose en su estructura, se sintetizó un nonapéptido llamado teprotido, que reducía la presión en sujetos hipertensos. ¿Por qué?
- 1.5. ¿Qué nueva familia de fármacos se desarrolló a partir de estos hallazgos?
- 1.6. Repase la farmacología del sistema renina-angiotensina: ¿Qué grupos de fármacos hay? ¿Qué mecanismos tienen? ¿Cuáles son las semejanzas y diferencias entre ellos? ¿Qué indicaciones tienen?

Figura 4. Ejemplo de algunos de los planteamientos y preguntas que se les formulan a los alumnos en uno de los Seminarios de la asignatura "Farmacología II" del Grado de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

trabajos originales de investigación, tanto de experimentos clásicos de la farmacología como de hallazgos de aparición reciente, así como estudios clínicos, fomentando el análisis crítico de los mismos. Tiene una duración de 120 minutos y se imparten a grupos reducidos de entre 20 y 25 alumnos, atendidos por el mismo profesor a lo largo de todo el curso. El contenido de cada seminario está previamente disponible en la página de docencia en red de la asignatura y los estudiantes deben resolverlos con anterioridad, de modo que durante el seminario los alumnos exponen y discuten entre ellos y con el profesor la solución de los distintos problemas y cuestiones planteadas.

En las figuras 3 y 4 se muestran dos ejemplos de cómo como integramos la investigación en dos estos Seminarios. En el primero de ellos, que corresponde a uno de los problemas que se plantean en el Seminario de Farmacología de la inflamación y el dolor, se les muestran cortes transversales de un vaso sanguíneo, marcado con un anticuerpo fluorescente frente a Ciclooxygenasa-2 (COX-2), y se formulan una serie de preguntas para que deduzcan, entre otros aspectos, los efectos adversos cardiovasculares de los fármacos inhibidores selectivos de COX-2. En el segundo, que corresponde a uno de los planteamientos del Seminario de Farmacología de la hipertensión, se hace referencia a un trabajo clásico, que sirvió de base para el desarrollo de los fármacos inhibidores del sistema renina angiotensina aldosterona.

Este tipo de seminarios han resultado ser extraordinariamente efectivos para asimilar más fácilmente los contenidos docentes de la asignatura y, al mismo tiempo, para adquirir competencias de investigación. Seminarios similares se imparten también en los grados de Enfermería y Nutrición.

#### 5.4. Introducción a la Investigación Biomédica

En el Plan actual de estudios del grado de Medicina de la UAM (33) hay unas asignaturas obligatorias específicamente dise-

ñadas para que obtengan las competencias de investigación como son: "Introducción a la Investigación Biomédica" (6 ECTS), "Investigación Epidemiológica" (3 ECTS), "Investigación Clínica experimental" (3 ECTS), "Trabajo Fin Grado (6 ECTS)".

Comentaré como llevamos a cabo la asignatura "Introducción a la Investigación Biomédica", que se imparte en tercer curso (34). Es una asignatura eminentemente práctica y en su impartición intervienen los cinco departamentos básicos de la Facultad (Anatomía, Bioquímica, Fisiología, Medicina Preventiva y Farmacología) y también el departamento de Medicina. Hay un coordinador por departamento y uno de ellos ejerce la coordinación general de forma rotatoria. Asimismo, participarán otros profesores de la Facultad en las lecciones magistrales, los seminarios interactivos y la tutorización de trabajos en grupo, para su posterior presentación en el Minicongreso.

Las actividades docentes que se realizan son las siguientes:

1. **Clases teóricas.** 5-6 clases dedicadas a aspectos generales incluidos en el proceso de indagación en investigación científica, la comunicación científica (tipos de publicaciones científicas, organización de una publicación...), el amplio campo multidisciplinar de la investigación biomédica o la Ética científica.
2. **Seminario interactivo** encaminado a que los alumnos conozcan y discutan la investigación más relevante que se realiza, para intentar resolver un problema biomédico concreto de gran prevalencia (ej, cáncer de colon, isquemia cardiaca, diabetes,...). Para ello, los coordinadores de la asignatura elaboran un guion, que los alumnos tienen disponible antes de



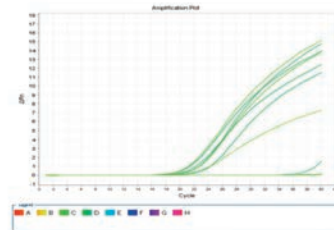
Seminario de "Introducción a la Investigación Biomédica" Sesión 1

5. Nuevas cepas del SARS-CoV-2 han ido apareciendo a lo largo de la pandemia. En la actualidad a variante B.1.1.7 (delta) se ha vuelto dominante en todo el mundo debido a su mayor transmisibilidad. La variante SARS-CoV-2 B.1.427/B.1.429 (épsilon) fue detectada por primera vez al comienzo de 2021 en California y en mayo de 2021 se ha detectado en otros 34 países.

**PREGUNTAS:**

• Busca en el siguiente artículo qué mutaciones tiene esta cepa de virus [Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant](#)

6. En la siguiente gráfica se muestran los resultados del análisis de diferentes muestras nasofaríngeas de diferentes pacientes por qRT-PCR para estudiar la carga viral:



**PREGUNTAS:**

- Explica mediante un esquema el proceso de la amplificación del RNA viral por qRT-PCR para el diagnóstico.
- ¿Por qué no sirve una PCR normal? ¿Por qué se llama en tiempo real?
- ¿Qué oligonucleótidos y qué controles se usan para validar los resultados de la qRT-PCR diagnóstica y por qué?
- Indica qué variables se representan en el eje X y en el eje Y de la gráfica de amplificación mostrada.
- Describe a nivel molecular que ocurre en las diferentes partes de la curva en S de la amplificación
- ¿Cómo se calcula la Ct a partir de esa gráfica? ¿Por qué la Ct es una medida de la carga viral del paciente?
- ¿Qué pacientes tendrían mayor carga viral de acuerdo a los resultados mostrados en la gráfica?

7. En la siguiente figura se muestran imágenes de biopsias pulmonares de pacientes con Covid19. Barras de calibración: a) 1 µm la izquierda y 200 nm en la derecha; b) 200 nm y c) 50 µm. IHC (inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Nucleocápside del SARS-Cov2).

**PREGUNTAS:**

- Describe cómo se han obtenido experimentalmente las diferentes imágenes mostradas, y lo que muestran
- ¿Qué indican las flechas rojas?
- ¿Qué conclusión obtiene de los resultados obtenidos?

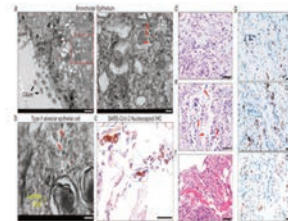


Figura 5. Ejemplo de algunos de los planteamientos y preguntas, que se les formularon a los alumnos en la sesión 1 del Seminario de la asignatura "Introducción a la Investigación Biomédica" del Grado de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (curso 2021-22).

las sesiones, en el que se incluyen figuras de trabajos originales y donde se pone de relieve el abordaje experimental, los controles necesarios, la interpretación de resultados y la crítica experimental. El seminario se desarrolla en tres sesiones, de 2 horas de duración cada una, y se imparte a grupos reducidos de alumnos. En cada sesión está presente un profesor por cada uno de los departamentos que participan en esta asignatura. La característica principal de los supuestos prácticos propuestos es el abordaje inter y multidisciplinar a la solución de un problema, lo cual se consigue fácilmente debido a la participación de profesores de distintos departamentos, tanto en su elaboración como en la impartición. Durante las sesiones los alumnos tienen que interpretar y discutir con sus compañeros y los profesores las figuras que se les presentan y contestar a las preguntas formuladas. En los últimos dos cursos académicos, este seminario ha estado enfocado a la investigación más relevante, que se ha realizado debido a la pandemia causada por el virus SarsCov2. En el seminario, los alumnos han tenido que interpretar y discutir resultados de artículos científicos relevantes que han llevado a conocer, la estructura del virus, sus variantes, la infectividad, la epidemiología, los ensayos clínicos con distintos fármacos, el desarrollo de las vacunas etc. Ello ha permitido a los estudiantes conocer en profundidad la investigación en este campo, así como reconocer la importancia de la investigación para resolver problemas médicos. En las figuras 5 y 6 se incluyen algunos ejemplos de planteamientos y preguntas de dicho seminario.

**3. Trabajo Tutorizado.** Constituye la parte más importante de la asignatura. El objetivo de esta actividad es familiarizar a los estudiantes con la investigación en biomedicina mediante una actividad guiada por un profesor en un tema, que ellos mismos pueden proponer, o bien es el profesor el que lo propone. Los estudiantes forman grupos de 4-5 estudiantes y cada grupo está a cargo de un profesor. El trabajo puede consistir en la realización y/o seguimiento de experimentos en marcha en el laboratorio del profesor, una revisión crítica de trabajos científicos publicados originales, una revisión crítica de trabajos científicos que constituyan paradigmas de la investigación biomédica o la redacción de un proyecto de investigación en un formato apropiado, entre otros. En cualquier caso, las actividades a realizar por los distintos grupos se coordinan para, dentro de su natural diversidad, garantizar actividades análogas en contenidos, formación y dificultad. El trabajo se realiza a lo largo del curso académico y como resultado final tienen que presentar un resumen de 250 palabras, un manuscrito con un máximo de 12 páginas, un Power Point de 6-8 diapositivas, y la posterior presentación del trabajo en el Minicongreso (ver más abajo). Cada grupo tiene también que participar en un taller de evaluación por pares, en el que evalúan otros trabajos, a modo de *referees*, y a su vez, su trabajo es evaluado por otros grupos, con la posibilidad corregirlo y/o de presentar alegaciones a las críticas recibidas, que en último término serán dirigidas por los profesores coordinadores. Además, se anima a los estudiantes a realizar sus trabajos escritos y su presentación oral en inglés.

### Seminario de "Introducción a la Investigación Biomédica" Sesión 3

14. El ensayo clínico randomizado RECOVERY es un estudio realizado a nivel mundial que evalúa posibles tratamientos para los pacientes Covid-19 (<https://www.recoverytrial.net/>). Es un estudio muy amplio y con varias ramas, que permitirá a los investigadores evaluar varios tratamientos al mismo tiempo, además de permitir cerrar varias de estas ramas rápidamente en el caso de que alguno de dichos tratamientos resulte ser efectivo o no efectivo. A continuación, se muestran algunos resultados obtenidos en este estudio con dexametasona.

#### PREGUNTAS:

- ¿Qué pacientes fueron incluidos en este ensayo?
- ¿Qué es la dexametasona? ¿Cuál es su mecanismo de acción?
- ¿Cuáles son las variables clínicas primarias estudiadas en este ensayo?
- Describa los resultados mostrados en la figura
- Además de dexametasona, ¿qué otros fármacos se probaron?
- En base a todos los resultados de este ensayo, proponga una conclusión final acerca del papel de la inflamación en el tratamiento de la Covid-19.

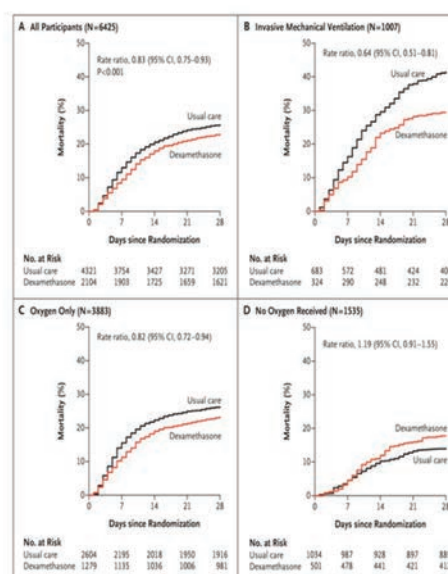


Figura 6. Ejemplo de algunos de los planteamientos y preguntas que se les formularon a los alumnos, en la sesión 3 del Seminario de la asignatura "Introducción a la Investigación Biomédica" del Grado de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (curso 2021-22).

4. **Minicongreso de Investigación Biomédica.** Constituye el foro para la presentación pública de la actividad realizada por los estudiantes en el desarrollo de sus trabajos tutorizados. Para su organización se elige un comité científico, formado por 6-10 estudiantes con el asesoramiento de un profesor. Este comité se encarga de organizar un concurso de carteles y arbitrar el método para seleccionar el cartel anunciador del Minicongreso, de conseguir financiación, de confeccionar el libro de resúmenes y de la ordenación temporal de las presentaciones de las diferentes sesiones. Cada sesión tiene una duración aproximada de 2 h y permite la presentación de 7 a 9 comunicaciones. Cada estudiante debe atender obligatoriamente a dos sesiones y a la conferencia inaugural, aunque se recomienda asistir a otras sesiones. Cada grupo dispone de un máximo de 10 min para presentar su comunicación seguido de 5 min de discusión. Un panel de evaluadores asiste a cada una de las sesiones del Minicongreso y evalúa a los estudiantes por las presentaciones (presentación formal, contenido, comunicabilidad) y su participación en la discusión. Como evaluadores participan profesores de los Departamentos coordinadores de la asignatura, así como profesores de los hospitales adscritos a la Facultad.

En resumen, consideramos que con las actividades docentes que se realizan en esta asignatura se consigue que los alumnos: 1) Conozcan, valoren críticamente y sepan utilizar las tecnologías y fuentes de información biomédica, para obtener, organizar, interpretar y comunicar información. 2) Comprendan e interpreten críticamente textos científicos. 3) Conozcan los principios del método científico y de la investigación biomédica. 4) Sepan redactar infor-

mes de forma comprensible a otros profesionales. 5) Sepan realizar una exposición en público, oral y escrita, de trabajos científicos y/o informes profesionales. Con ello, adquirirán muchas de las competencias de investigación que se proponen en el Plan de estudios.

## 6. CONCLUSION

La docencia y la investigación conforman las dos funciones básicas del profesorado universitario, funciones que deben entrelazarse y contribuir de esta forma a los procesos de enseñanza y de aprendizaje. El vínculo entre ambas funciones se sustenta mejor cuando los profesores son verdaderamente investigadores activos, lo que facilita la actualización de los contenidos impartidos y que los alumnos aprendan a investigar investigando. La experiencia de la Facultad de Medicina de la UAM y concretamente del Departamento de Farmacología, permite concluir que las relaciones entre investigación y docencia pueden aportar beneficios en el aprendizaje y la formación de los alumnos. Pese a ello, en la actualidad no se evidencia en los alumnos de medicina una genuina inclinación por la actividad científica, estando más centrados en su formación disciplinar. Por su parte, los docentes no siempre utilizan estrategias para integrar la investigación en su práctica docente, ni para fomentar en el estudiante una actitud crítica y creativa, necesaria para el desarrollo de la capacidad investigadora.

*"Hay pocas cosas terrenas más hermosas que la universidad: un lugar donde los que odian la ignorancia pueden luchar por el conocimiento, y donde quienes perciben la verdad pueden luchar para que otros la vean"*

*John Edward Masefield (1878-1967)*

**Integración de la investigación con la docencia.**

**Experiencia de un Departamento universitario**

Mercedes Salas Sánchez





## 7. REFERENCIAS

1. Magna Charta Universitatum. Disponible en: <http://www.magna-charta.org/resources/files/the-magna-charta/spanish>.
2. Ley Orgánica 6/2001, de 21 de diciembre, BOE de 24 de diciembre de 2001.
3. Anteproyecto de Ley Orgánica del Sistema Universitario. Disponible en: <https://www.universidades.gob.es/portal/site/universidades/menuitem.21ef60083f296675105f2c10026041a0/?vgnnextoid=660607559eaaab710VgnVCM1000001d04140aRCRD..>
4. Centro de investigación Biomédica en Red (CIBER). Disponible en: <https://www.ciberisciii.es/>.
5. U-Ranking 2021; novena edición. Indicadores Sintéticos de las Universidades Españolas. Disponible en: <https://www.fbbva.es/wp-content/uploads/2021/06/Informe-U-Ranking-FBBVA-Ivie-2021.pdf>.
6. Conferencia de Rectores de Universidades Españolas (CRUE). La Universidad Española en Cifras 2017-2018. Disponible en: [https://www.crue.org/wp-content/uploads/2020/02/UEC-1718\\_FINAL\\_DIGITAL.pdf](https://www.crue.org/wp-content/uploads/2020/02/UEC-1718_FINAL_DIGITAL.pdf).
7. Academic Ranking of world universities, (ARWU). 2021. Disponible en: <http://www.shanghairanking.com/>.
8. QS World University Rankings 2022. Disponible en: <https://www.topuniversities.com/university-rankings/world-university-rankings/2022..>
9. Times Higher Education (THE). Disponible en: <https://www.timeshighereducation.com/world-university-rankings/2022>.
10. Weber M. El político y el científico. Disponible en: <http://www.hacer.org/pdf/WEBER.pdf>.
11. El País 13/04/2001. Entrevista a Carl Wieman. Disponible en: [https://elpais.com/diario/2001/04/11/futuro/986940010\\_850215.html](https://elpais.com/diario/2001/04/11/futuro/986940010_850215.html).
12. El Economista, 6/11/2018. Entrevista Carl Wieman. Disponible en: <https://www.eleconomista.es/ecoaula/noticias/9500828/11/18/Carl-Wieman-Nobel-de-Fisica-Pensar-como-un-cientifico-es-un-objetivo-de-la-ensenanza-y-una-necesidad-educativa-vital-en-la-sociedad-moderna.html>.
13. ABC 20/10/2018. Entrevista a Carl Wieman. Disponible en: [https://www.abc.es/ciencia/abc-carl-wieman-ensenanza-ciencia-universidad-realmente-medieval-201810200139\\_noticia.html](https://www.abc.es/ciencia/abc-carl-wieman-ensenanza-ciencia-universidad-realmente-medieval-201810200139_noticia.html).
14. Sancho Gil JM. Docencia e investigación en la universidad: una profesión, dos mundos. *Educación* 2001; 28: 41-60.
15. Hernández Pina F. Docencia e investigación en educación superior. *Revista de Investigación Educativa* 2002; 20: 271-301.
16. Brew A. Teaching and research: new relationships and their implications for inquiry-based teaching and learning in higher education. *Higher Education Research and Development* 2012; 31: 101-114.
17. López Gómez E. Conectando investigación y docencia en la universidad: teaching research nexus. *Teor. educ.* 2015; 27: 203-220.
18. Salas Carvajal E. Relación entre investigación y docencia universitaria: concepciones de un grupo de académicos de un programa de formación inicial de profesores de ciencias. X Congreso internacional sobre investigación en didáctica de las ciencias. Sevilla. 5-8 de septiembre de 2017.
19. Bage G. Putting research first? Perspectives from academics and students on first-year undergraduates learning research. *Student Success* 2019; 10: 73-85.
20. Verburgh A, Elen J, Lindblom-Ylänne S. Investigating the myth of the relationship between teaching and research in higher education: A review of empirical research. *Stud Philos Educ* 2007; 26: 449-465.
21. Webster D. Does research productivity enhance teaching? *Educational Record* 1985; 66: 60-62.
22. Elton L. Research and teaching: symbiosis or conflict. *Higher Education* 1986; 15: 299-304.
23. Ramsden P, Moses I. Associations between research and teaching in Australian higher education. *Higher Education* 1992; 23: 273-295.
24. Feldman KA. Research productivity and scholarly accomplishment of college teachers as related to their instructional effectiveness: A review and exploration. *Research in Higher Education* 1987; 26: 227-298.
25. Hattie J, Marsh HW. The relationship between research and teaching: a meta-analysis. *Review of Educational Research* 1996; 66: 507-542.
26. Jenkins A, Blackman T, Lindsay R, Paton-Saltzberg R. Teaching and research: student perspectives and policy implications. *Studies in Higher Education* 1998; 23: 127-141.
27. Centra J A Research Productivity and Teaching Effectiveness. *Research in Higher Education* 1983; 18: 379-389.
28. Terenzini PT. Research and practice in undergraduate education: And never the twain shall meet. *Higher Education* 1999; 38: 33-48.
29. Brew A, Boud D. Teaching and research: establishing the vital link with learning. *Higher Education* 1995; 29: 261-273.
30. Tesouro M, Corominas E, Teixidó J, Puiggalí J. La autoeficacia docente e investigadora del profesorado universitario: relación con su estilo docente e influencia en sus concepciones sobre el nexo docencia-investigación. *Revista de Investigación Educativa* 2014; 32: 169-186.
31. Galbraith CS, Merrill GB. Faculty research productivity and standardized student learning outcomes in a university teaching environment: a Bayesian analysis of relationships. *Studies in Higher Education*, 2012; 37: 469-480.
32. Universidad Autónoma de Madrid. Memoria verificación Grado de Medicina. Disponible en: [file:///D:/usuarios/usuario/Downloads/Memorial\\_final\\_Medicina.pdf](file:///D:/usuarios/usuario/Downloads/Memorial_final_Medicina.pdf).
33. Universidad Autónoma de Madrid. Plan de de Graduado en Medicina. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2017/08/03/pdfs/BOE-A-2017-9258.pdf>.
34. Universidad Autónoma de Madrid. Guía Académica asignatura "Introducción a la Investigación Biomédica". Grado de Medicina. Disponible en: [https://secretaria-virtual.uam.es/daa/consultaPublica/look\[con-pub\]MostrarPubGuiaDocAs](https://secretaria-virtual.uam.es/daa/consultaPublica/look[con-pub]MostrarPubGuiaDocAs).

Si desea citar nuestro artículo:

**Integración de la investigación con la docencia. Experiencia de un Departamento universitario**

Mercedes Salaices Sánchez

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nºextra (2022). pp. 529-542

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.19>

# ASPECTOS FUNCIONALES, NUTRICIONALES, SALUDABLES Y COMERCIALES DE PROTEÍNAS VEGETALES COMO ALTERNATIVA PARA ANÁLOGOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS: REVISIÓN

## FUNCTIONAL, NUTRITIONAL AND COMMERCIAL ASPECTS OF PLANT-BASED PROTEINS AS ALTERNATIVE FOR MEAT PRODUCTS ANALOGUES. A REVIEW

Iciar Astiasarán<sup>1</sup>; Larisa Giura<sup>2</sup>; Diana Ansorena<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Académica correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Dra. en Farmacia. Catedrática de Nutrición y Bromatología. Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología, Centro de Investigación en Nutrición, Facultad de Farmacia y Nutrición, Universidad de Navarra, IDISNA – Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona. Dirección: C/Irunlarrea s/n 31008 Pamplona, Navarra, España.

<sup>2</sup>Lcda. en Ingeniería Alimentaria. Investigadora de I+D+i. Departamento de I+D+i. Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria. CNTA. Dirección: NA 134, Km. 53. 31570 San Adrián, Navarra, España. Doctoranda en el Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología, Centro de Investigación en Nutrición, Facultad de Farmacia y Nutrición, Universidad de Navarra, IDISNA – Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona. Dirección: C/Irunlarrea s/n 31008 Pamplona, Navarra, España.

<sup>3</sup>Dra. en Farmacia. Catedrática de Nutrición y Bromatología. Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología, Centro de Investigación en Nutrición, Facultad de Farmacia y Nutrición, Universidad de Navarra, IDISNA – Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona. Dirección: C/Irunlarrea s/n 31008 Pamplona, Navarra, España.

**corresponding author:** <sup>1</sup>icastiasa@unav.es; <sup>2</sup>lgiura@cнта.es; <sup>3</sup>dansorena@unav.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

El interés por las proteínas vegetales se ha incrementado en los últimos años al constituir una alternativa idónea para la elaboración de productos análogos a alimentos tradicionales de origen animal. Además de las ventajas de su producción, más sostenible que la producción de proteína de origen animal, es mejor aceptada por parte de los consumidores que otras alternativas como los insectos o la carne cultivada. Las propiedades tecno-funcionales de las proteínas vegetales pueden mejorarse con la aplicación de tecnologías tradicionales y emergentes. Desde el punto de vista nutricional, se puede conseguir compensar algunos déficits con una dieta variada. Existen aún retos tecnológicos, tanto en cuanto a su producción como en cuanto a su empleo en el desarrollo de alimentos con propiedades saludables, alternativos a sus homólogos de origen animal.

#### ABSTRACT

*The interest in vegetable proteins has increased in recent years as they represent a great alternative for the production of analogue products to traditional animal origin foods. In addition to the advantages of its production, which is more sustainable than animal protein production, this option is better accepted by consumers than other alternatives such as insects or cultured meat. The techno-functional properties of vegetable proteins can be improved with the application of traditional and emerging technologies. From a nutritional point of view, it is possible to compensate for some deficits with a varied diet. There are still technological challenges, both in terms of their production and also of their use in the development of healthy foods, alternatives to their counterparts of animal origin.*

#### Palabras Clave:

proteínas  
tecno-funcional  
sostenibilidad  
vegetales

#### Keywords:

proteins  
techno-functionality  
sustainability  
vegetables



## 1. INTRODUCCIÓN

Una dieta rica en productos de origen animal con un aporte excesivo de grasa total, grasa saturada y colesterol se asocia con enfermedades de gran morbi-mortalidad como las enfermedades cardiovasculares y también, en el caso de carnes rojas y carnes procesadas, con factores de riesgo de cáncer (1). A estos aspectos relacionados con la salud se ha sumado en los últimos años la preocupación por la sostenibilidad del planeta. La producción de alimentos de origen animal contribuye de una forma muy significativa a la emisión de gases de efecto invernadero (2) considerándose insostenible mantener una alimentación basada en este sistema para el previsible incremento de la población mundial en los años venideros (3).

Una de las funciones más relevantes en la dieta de los alimentos de origen animal es su aporte de proteínas, tanto en cantidad como en calidad. Las tendencias actuales para sustituir estos alimentos sin que se produzca un detrimento del aporte proteico son tres: alimentos a base de proteína vegetal, insectos y carne cultivada. En general, la alternativa de alimentos a base de proteína vegetal es más aceptada por parte de los consumidores que las otras dos (4). En concreto en España un estudio del año 2021 revela que casi el 60% de los españoles optaría por alternativas vegetales con mayor frecuencia para llevar una dieta más respetuosa con el planeta, mientras que solo el 22% estaría dispuesto a incluir en su mesa carne de laboratorio y el 19%, se atrevería a comer insectos (5).

Se estima que la producción de alimentos de origen vegetal alternativos de la carne supone una reducción en la emisión de gases del orden de 30-90 veces inferior que la producción tradicional, por lo que el consumo de proteínas vegetales alternativas puede ser una herramienta clave para mitigar el cambio climático (6).

## 2. ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES

Las proteínas constituyen uno de los principales macronutrientes, tanto por su aporte calórico como por su importante función estructural en el organismo. También en los alimentos tienen una importante función tecnológica gracias a sus propiedades de solubilidad, retención de agua y grasa, gelificación, emulsificación, formación de espuma y texturización.

Las proteínas se clasifican según su estructura en fibrilares, flexibles y globulares (7). Las proteínas fibrilares, como miosina, actina, colágeno o elastina son proteínas de origen animal con una estructura helicoidal compleja que permite establecer las estructuras

musculares características de los animales. En el grupo de las proteínas flexibles se encuentra la caseína, con una estructura intermedia que permite conformaciones flexibles dependiendo de las condiciones del medio. También la gelatina (colágeno sometido a altas temperaturas) alcanza esta conformación flexible.

Las proteínas vegetales son principalmente proteínas globulares: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas de diferente concentración), prolaminas (solubles en soluciones alcohol-agua) y glutelinas (insolubles en agua y solubles en soluciones ácidas o básicas). Las principales fuentes de proteínas vegetales son las legumbres (21-40% de proteína) y los cereales (6-15% de proteína). Las albúminas y globulinas constituyen más del 50% del total de proteínas en las legumbres, mientras que las prolaminas y glutelinas constituyen un 85% de la proteína total en los cereales (trigo, maíz, centeno, arroz) y pseudocereales (quinoa). Las proteínas que se obtienen para la elaboración de alimentos con proteína vegetal suelen estar en forma de harinas (10-20% de proteína), de concentrados (55-60% de proteína) o aislados de proteína (> 80% de proteína) (8).

La extracción de las proteínas a partir de las materias primas para conseguir concentrados o aislados de proteína de alta calidad puede ser compleja teniendo en cuenta que exige rendimientos altos y la necesidad de eliminar una serie de compuestos presentes en las materias primas, especialmente en el caso de las legumbres, con propiedades antinutritivas (fitatos, saponinas, lecitinas, inhibidores de proteasas, alfa-galactósidos, alcaloides, polisacáridos y polifenoles) e incluso factores antitecnológicos (que disminuyen las propiedades tecnológicas de las proteínas y entre los que se encuentran: minerales, triacilglicéridos, azúcares reductores y la mayoría de las sustancias antinutritivas). Los procesos de extracción tradicionales pueden hacerse en seco (molido de la materia prima y posterior clasificación atendiendo al tamaño de partícula, densidad y propiedades electromagnéticas) o en húmedo (ruptura de las paredes celulares, solubilización de las proteínas en medio alcalino y posterior precipitación, siendo este último normalmente el más eficiente en cuanto a la obtención de extractos más puros, de mayor calidad y digestibilidad. Actualmente son varias las tecnologías emergentes que se emplean para mejorar estos procesos de extracción y purificación de las proteínas, aún con resultados diversos (9). Hay que tener en cuenta además que todas estas tecnologías (como se verá más adelante) pueden afectar a las propiedades tecnológicas de las proteínas extraídas y por ende, a su potencial aplicación.

Debido a sus diferentes estructuras, los diferentes tipos de proteínas poseen una variedad de propiedades funcionales/tecnológicas y además éstas varían de forma significativa en cada grupo según el tipo concreto de proteína, la cadena aminoacídica, los gru-



pos hidrófobos/hidrófilos superficiales, su peso molecular, los tratamientos a los que se vea sometida y el resto de componentes de la matriz en que se encuentre con los que puede sufrir diferentes grados de interacción (10). En general, las proteínas vegetales poseen propiedades tecnológicas mucho más pobres que las proteínas animales, de ahí que el conseguir las texturas adecuadas (similares a los productos originales) cuando se desarrollan alimentos alternativos a los de origen animal (carnes, lácteos, pescados) sea uno de los grandes retos.

A continuación se expone un breve resumen de los procesos físicos, químicos y enzimáticos que se utilizan en la actualidad en la industria alimentaria para mejorar las propiedades tecnológicas de las proteínas vegetales necesarias para sus diferentes aplicaciones en el desarrollo de alimentos sustitutivos de alimentos de origen animal (8, 9).

A. Procesos físicos: provocan la reducción del tamaño de las moléculas proteicas, su redistribución, desplegamiento de las estructuras, disgregación e incluso su desnaturalización.

1. Tratamiento térmico. La energía térmica normalmente produce la movilidad de los péptidos y en definitiva el desplegamiento y la desnaturalización de las proteínas. Como consecuencia las proteínas tienden a agregarse y la solubilidad disminuye. En algunos casos se han descrito incrementos en las propiedades emulsionantes debido a agregaciones hidrofóbicas y la consiguiente difusión de moléculas proteicas a la interfase aceite-agua. Cuando el grado de desnaturalización proteica es elevado se pueden formar geles cuyas características dependerán, además de la naturaleza de la proteína, de las condiciones del entorno (pH, sales, etc.) y de las condiciones del tratamiento (Temperatura, velocidad del calentamiento y posterior enfriamiento).

2. Ultrasonidos. La aplicación de ultrasonidos (longitudes de onda  $>16\text{KHz}$  no audibles por el ser humano) a un medio causa movimientos de compresión y relajación intermitentes que en el caso de las proteínas provoca un cizallamiento hidrodinámico que modifica la estructura rompiendo las moléculas y modificando su distribución en el medio. También puede generarse un calentamiento suficiente para sumarse a la degradación térmica de las moléculas.

3. Altas Presiones. Las altas presiones (normalmente entre 200 y 700 MPa) favorecen la capacidad de gelificación de las proteínas vegetales al comprimir las cavidades de las proteínas y favorecer la ruptura y formación de nuevos enlaces no covalentes. La dureza del gel se incrementa con la intensidad del tratamiento. También las propiedades emulsionantes se ven favorecidas por los tratamientos con altas presiones.

4. Cocción por Extrusión. Es una tecnología que mezcla el calen-

tamiento, con alta fuerza de cizalla y alta presión consiguiendo un producto esterilizado y con formas y texturas particulares. Cuando se aplica a proteínas vegetales se modifican las propiedades de solubilidad, emulsión, textura y gelificación obteniendo proteínas texturizadas con las que se pueden fabricar, especialmente en condiciones de alta humedad (50-80%) análogos a la carne.

5. Plasma Frío. Se trata de una tecnología emergente no térmica que se aplica a las superficies de los alimentos con fines de esterilización o de modificación de la funcionalidad proteica. Consiste en la generación, a partir de una fuente energética (eléctrica, térmica, electromagnética, etc.) aplicada a un medio gaseoso, de una mezcla de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y radiaciones ultravioletas. Cuando se aplica a las proteínas se rompen los enlaces covalentes internos y los enlaces de azufre y "en definitiva" se modifica la estructura e incluso se rompen las cadenas polipeptídicas.

B. Procesos químicos: provocan cambios en la carga neta de las proteínas sustituyendo los grupos amino e hidroxilo de determinados aminoácidos residuales por otros grupos funcionales. Aunque en general se consiguen buenas propiedades funcionales en las proteínas resultantes su aplicación es más limitada por ser procesos más costosos y que generan más residuos.

1. Glicosilación. Consiste en la adición de una molécula de carbohidrato a la cadena lateral de residuos de lisina o de otros N terminales formando productos estables conjugados proteína-polisacárido. Estas reacciones ocurren normalmente durante la reacción de Maillard y su intensidad depende de las condiciones de temperatura, tiempo, pH, humedad relativa, ratio entre proteína y polisacáridos. En general estos compuestos glicosilados poseen mejores propiedades funcionales que las proteínas de origen.

2. Acilación. Consiste en transferir un grupo acilo a los grupos amino o hidroxilo de los aminoácidos. Según sea el grupo acilo transferido la denominación de la reacción se particulariza: acetilación (el grupo transferido es un grupo acetilo a partir normalmente del anhídrido acético), succinilación (el grupo transferido es el grupo succinilo a partir normalmente del anhídrido succínico), etc. Estas modificaciones provocan una reducción en la carga neta superficial de la proteína, desdoblamiento y, en definitiva, mejoras en las propiedades de emulsificación, solubilidad y gelificación.

3. Desaminación. Consiste en la pérdida de un grupo amino al someter a la proteína a altas temperaturas en un medio ácido o alcalino, lo que origina la conversión de asparagina y glutamina en sus correspondientes ácido aspártico y glutámico. Esta modificación provoca un incremento de la carga neta, disminución de



las interacciones y desplegamiento de las proteínas. Debido a que los cereales son especialmente ricos en asparagina y glutamina este proceso se ha utilizado bastante para mejorar sus propiedades funcionales. Sin embargo, si no se controla la reacción y la desaminación es excesiva se produce el efecto contrario.

4. Fosforilación. Consiste en la unión a las proteínas, a través de enlaces covalentes con los grupos hidroxilo, sulfidrido o amino, de grupos fosfatos aportados por diferentes reactivos (ej. tripolifosfato sódico). La fosforilación incrementa el carácter hidrofílico y la solubilidad de las proteínas. Su aplicación a proteínas, especialmente de cereales, ha mostrado también mejoras en las propiedades emulsionantes.

C. Procesos enzimáticos. Se pueden emplear enzimas proteolíticas que hidrolizan las proteínas o enzimas no proteolíticas que producen entrecruzamientos entre cadenas peptídicas generando nuevas estructuras proteicas. También se incluyen en estos procesos la metabolización de las proteínas por parte de los microorganismos.

1. Hidrólisis enzimática. Enzimas como pepsina, tripsina, alcalasa o papaína se emplean para romper la estructura primaria de las proteínas generando péptidos más pequeños y afectando a la capacidad funcional. Hay que tener en cuenta que un exceso de hidrólisis puede generar sabores amargos por exceso de péptidos de bajo peso molecular. Con un buen control del proceso de hidrólisis pueden conseguirse las adecuadas propiedades de solubilidad, emulsificación o gelificación.

2. Entrecruzamiento enzimático. Con enzimas como la transglutaminasa pueden generarse macroestructuras con capacidades texturizantes interesantes.

3. Fermentación. Aunque tradicionalmente se ha empleado esta técnica para mejorar las propiedades nutricionales, efectos saludables, perfiles sensoriales o vida útil de los alimentos, se ha visto que su efecto sobre las moléculas proteicas también impacta en las capacidades tecnológicas como la emulsificación.

En la Tabla 1 se presentan ejemplos concretos de trabajos publicados sobre el efecto de diversas tecnologías sobre las proteínas y sus propiedades.

**Tabla 1.** Efectos de diferentes procesos tecnológicos sobre las propiedades funcionales de proteínas vegetales de diferente naturaleza.

Tipo de proteína	Tratamiento	Condiciones	Resultados observados	Referencias
Concentrados de proteína de lenteja y guisante	Altas Presiones	600 MPa, 4 min, 5°C	Formación de geles (más accesibles a la proteólisis gástrica)	-60
Concentrado de proteína de guisante	Altas Presiones	HPP a 250–550 MPa, 15 min, 20–33°C	Desnaturalización de proteínas (a partir de 350 MPa) y formación de gel.	-61
Aislado de proteína de frijol rojo	Altas Presiones y Tratamiento enzimático	HPP a 300, 450, 600 MPa, 15 min y 1.0 - 0.5% Alcalase (E/ S), 50 °C, 4h)	Reducción del comportamiento tixotrópico tras la hidrólisis. Formación de péptidos bioactivos de alta funcionalidad (con actividad antioxidante)	-62
Aislado de proteína de quinoa	Tratamiento térmico	95°C, 30 min	Incremento de la solubilidad y de la estabilidad de la espuma	-63
Aislado de proteína de guisante	Tratamiento térmico	95°C, 30 min	Provoca interacciones hidrofóbicas internas en la fase continua de la emulsión con la consecuente floculación.	-64
Aislado de proteína de haba	Ultrasonidos	72.6% de amplitud durante 17.29 min	Incremento de la solubilidad y de la estabilidad de la espuma	-65
Concentrado de proteína de mijo	Ultrasonidos	73.95 W/cm <sup>2</sup> intensidad durante 12.5 min	Incremento de EAI (emulsion activity index) y de ES (emulsion stability)	-66
Aislado de proteína de cacahuete	Plasma frío	35 V y 2 ± 0.2 A durante 1,2,3,y 4 min	Mejora de solubilidad, propiedades de emulsión y capacidad de retención de agua.	-67
Aislado de proteína de cacahuete	Extrusión en caliente	Extrusión a 130°C	Mejora de propiedades de emulsificación	-68
Concentrado de proteína de garbanzo	Fermentación	37 °C, 72h	Incremento de propiedades funcionales	-69
Proteína de salvado de arroz	Modificación química	Fosforilación (pH 9)	Mejora la solubilidad y las propiedades de emulsificación.	-70



### 3. ASPECTOS NUTRITIVOS DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES

Tradicionalmente los alimentos de origen vegetal son considerados como fuente relevante de compuestos bioactivos, vitaminas y minerales desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de un buen estado de salud. Sin embargo, en los últimos años se ha prestado especial atención a su fracción proteica (11).

Estudios recientes ponen de manifiesto que, desde el punto de vista cuali y cuantitativo, la ingesta proteica en dietas vegetarianas bien diseñadas no está comprometida (12) a pesar de que los alimentos vegetales presentan, en general, menor digestibilidad proteica y ciertas deficiencias en el perfil de aminoácidos esenciales respecto a las proteínas de origen animal (13). La composición en aminoácidos esenciales también varía de unas proteínas vegetales a otras (14,15). Así, las legumbres presentan bajas cantidades de aminoácidos azufrados, como la metionina y cisteína, mientras que en el caso de los cereales son semejantes a los de la proteína animal. Por su parte, los cereales presentan como aminoácido limitante la lisina, aunque los pseudocereales como el amaranto o la quinoa son buena fuente de este aminoácido (15). El maíz o el sorgo, por su parte, muestran niveles altos de leucina, potente estimulador del crecimiento muscular, semejantes a la proteína láctea.

Además de estas diferencias en cuanto a composición, es preciso considerar la capacidad del organismo para digerir los distintos tipos de proteína y absorber sus aminoácidos y lograr un aprovechamiento nutritivo óptimo. Para ello se determina experimentalmente, para cada proteína, su valor de digestibilidad que, junto con el perfil cuantitativo de aminoácidos da lugar a un valor (DIAAS- *Digestible Indispensable Amino Acid Score*) que permite identificar su calidad nutritiva. Un valor de 1 o superior significa que la calidad de la proteína evaluada es semejante a la proteína de referencia (16). Este valor es del orden de 0.9-1.08 para la proteína de suero y la leche, respectivamente, mientras que disminuye en el caso de las proteínas vegetales: 0.85 para la patata, 0.66 para el guisante, 0.75 para las lentejas, y menor a 0.50 para los cereales. Una excepción a estos valores inferiores a 0.85 en alimentos de origen vegetal es la proteína de soja, con un valor de 0.92 (17). La soja presenta valores significativos de arginina, glutamina y glicina que, si bien no son esenciales, ejercen funciones muy relevantes en el organismo.

La digestibilidad de las proteínas depende de varios factores. Uno de ellos es su estructura. Así, las proteínas vegetales tienen una mayor presencia de láminas beta y menor número de hélices alfa que las proteínas de origen animal, lo que las hace más resistentes a la digestión enzimática (18). La digestibilidad también depende de la intensidad de tratamientos térmicos que hayan recibido o de la presencia en el alimento de compuestos antinutritivos

(citados anteriormente), que dificultan su digestión actuando a través de distintos mecanismos (interfieren en procesos metabólicos, afectan a la fisiología gastrointestinal o dificultan la actividad enzimática, por mencionar algunos).(19).

A continuación se resumen algunos de los tratamientos más relevantes descritos por Sá et al. (19) para incrementar la digestibilidad proteica. Todos ellos buscan la inhibición o la destrucción de los mencionados factores antinutritivos. En el caso de los tratamientos que aplican calor es preciso tener en cuenta que las altas temperaturas podrían afectar negativamente a la calidad nutritiva del alimento por destruir micronutrientes termolábiles, por lo que habrá que valorar el balance global del efecto del tratamiento sobre el valor nutritivo del alimento.

1. Cocción: favorece la lixiviación de compuestos no deseados y destruye los inhibidores de proteasas, incrementando así la digestibilidad de alubias, guisantes, garbanzos y otras legumbres, en tratamientos a 100°C de 10-60 minutos de duración. Ahora bien, sobrecalentamientos podrían disminuir la digestibilidad proteica vía reacción de Maillard y cambios conformacionales en las proteínas.
2. Autoclave: de efecto similar a la cocción, se ha observado que incrementa la digestibilidad proteica en boniato, garbanzo, avena o guisante.
3. Microondas: genera calor instantáneo por rotación de dipolos y movimiento iónico, y es muy eficaz en la inactivación de inhibidores de proteasas en legumbres. Se han observado resultados significativos en tratamientos de 3 minutos a 800W.
4. Germinación: lleva consigo una disminución de los polifenoles y ácido fítico, además de activar enzimas proteolíticas que favorecen la digestibilidad proteica. Los tratamientos pueden oscilar entre 48-96 h a 25-30°C.
5. Irradiación: los resultados de la aplicación de esta tecnología no son concluyentes, dado que se han descrito trabajos en los que la digestibilidad proteica disminuye y otros en los que mejora la calidad proteica.
6. Fermentación: se ha observado que mejora el valor nutritivo de una gran variedad de legumbres y cereales en tratamientos que oscilan entre 25-70°C durante 5-96h. Ocasionan desnaturalización parcial de las proteínas y reducción de compuestos no deseados a través de la acción de enzimas microbianas.
7. Extrusión: favorece la digestibilidad mediante la hidrólisis proteica dependiendo de las condiciones del proceso (temperatura, velocidad de extrusión, presión, entre otros).
8. Altas Presiones: favorecen la desnaturalización y su posterior hidrólisis y liberación de péptidos.

En cualquier caso, los valores individuales de la calidad de cada proteína no son tan importantes como la evaluación de la calidad de la proteína de la dieta total. Ésta puede ser idónea si se



consumen alimentos de origen vegetal en abundancia, y lo más variados posible. Se ha observado que, a mayor diversidad de alimentos vegetales en la dieta, mejor es la calidad de la misma. La incorporación de mayor cantidad de legumbres, frutos secos, semillas y vegetales a la dieta resulta imprescindible para lograr este objetivo (20). De hecho, se ha trabajado en herramientas digitales para optimizar la formulación de alimentos de origen vegetal que crean combinaciones de diferentes ingredientes de proteínas vegetales, con restricciones personalizables, como el peso de la mezcla, la cantidad y el tipo de ingredientes, garantizando una calidad proteica excelente (21). Respecto al tipo de ingredientes, a lo largo de los últimos años se están explorando como nuevas fuentes proteicas vegetales, entre otras, el haba (22), la quinoa y lenteja (23), el amaranto y la chía (24), el cáñamo (25), la colza (26) o la semilla de algodón (27).

Las proteínas vegetales constituyen también una magnífica oportunidad para el desarrollo de alimentos enriquecidos en compuestos bioactivos. En general los compuestos con propiedades beneficiosas con los que se quiere enriquecer los alimentos para que puedan ser considerados como funcionales tienen unas características deficitarias desde el punto de vista tecnológico. Así compuestos antioxidantes como la mayoría de los compuestos fenólicos, vitaminas o aceites esenciales o los omega 3 tienen una baja estabilidad en las matrices alimentarias, son a veces difícilmente solubles y “en definitiva” es difícil que alcancen una buena biodisponibilidad en el organismo. Las proteínas vegetales pueden, con los adecuados tratamientos tecnológicos, convertirse en transportadores de dichos compuestos en forma de nanopartículas, emulsiones, geles, etc., proporcionándoles la adecuada protección y asegurando una adecuada liberación en el organismo. Proteínas como la proteína de soja, zeína, gluten o proteína de arroz han sido ampliamente estudiadas con estos fines (28). Gumus et al. (29) demostraron que las proteínas de lenteja, haba y guisante podían usarse para encapsular ácidos grasos poliinsaturados omega 3 sin que se produjese ningún efecto negativo sobre su liberación en el proceso de digestión *in vitro*.

Por otro lado, también es necesario mejorar la producción de las cosechas para que proporcionen más cantidad de proteína y de mejor calidad, así como ampliar las variedades con el fin de que se adapten mejor a diferentes climas y regiones (30).

#### 4. EFECTOS SOBRE LA SALUD DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES

Estudios realizados con amplias cohortes muestran que las dietas basadas en el consumo de proteína vegetal están inversamente relacionadas con la tasa de mortalidad (31,32). Sin embargo, es difícil concluir acerca de los potenciales efectos de la ingesta de proteína vegetal sobre la salud. Los estudios existentes

son bastante recientes y, en general, los resultados encontrados generan incertidumbres por el bajo número de personas incluidas en el estudio, por la corta duración de los mismos, o porque no queda claro si el efecto se puede atribuir a la proteína vegetal o a otros componentes vegetales que la acompañan al ingerir este tipo de dietas. De ahí que la mayoría de los autores coinciden en que se requiere más evidencia científica acerca de todos estos efectos.

A continuación se hace un breve resumen de los principales resultados encontrados hasta el momento sobre enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedad renal, cáncer y alergias (17).

Enfermedades cardiovasculares. Existe bastante discrepancia acerca de los posibles efectos beneficiosos de la sustitución de la proteína animal por proteína vegetal en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Li et al. en una revisión sistemática y meta análisis de 112 ensayos randomizados realizados en personas adultas con y sin hiperlipidemia observaron que en general los biomarcadores de enfermedad cardiovascular estaban disminuidos en el consumo de proteína vegetal frente a la proteína animal (33). En concreto observaron una disminución de lípidos sanguíneos incluyendo LDL-colesterol, no HDL-colesterol y apolipoproteínas B. Zhao et al. (34) hicieron un metaanálisis incluyendo 32 ensayos de intervención, la mayoría de ellos con proteína de soja como sustituto de la proteína de carne, en los que encontraron también una disminución de los perfiles lipídicos.

En el estudio HELENA (*Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence*) se sugiere que el incremento del consumo de proteína vegetal en sustitución de la proteína animal puede ayudar en el control de la obesidad además de tener efectos positivos en los factores cardiometabólicos (35).

Campbell et al. (36) señalan “sin embargo” que no existe una evidencia científica consolidada y contrastada acerca del efecto positivo sobre los biomarcadores cardiovasculares al sustituir la proteína animal por vegetal. Estos autores sí que encuentran en su estudio cierta evidencia de un efecto positivo cuando la carne roja se sustituye por carne blanca. Por el contrario, Bergeron et al. (37) en un estudio cruzado randomizado no encuentran diferencias entre proteína de carne blanca y roja, pero sí observan beneficios cuando se ingiere proteína no animal frente a proteína animal, aunque ellos mismos señalan que los resultados no son concluyentes.

Wang et al. en un trabajo reciente en el que intentan analizar la influencia de diversos alimentos ricos en proteína tanto de origen vegetal como animal sobre el riesgo de enfermedades cardiovasculares enfatizan la importancia del efecto global de los alimentos y la dieta frente al efecto de un determinado tipo de proteína, ya que este último es difícil de demostrar desde el punto de vista metodológico. En el mismo trabajo los autores sugieren el importante papel de la microbiota en dichos efectos (38).



**Diabetes.** Es cierto que, en general, las dietas vegetarianas se asocian con beneficios para los pacientes con diabetes, pero no está claro que esos efectos se deban a la proteína vegetal. Hassan-zadeh-Rostami et al. en un ensayo randomizado con pacientes con diabetes tipo 2 no encontraron diferencias entre aquellos sometidos a dietas con proteína animal, con proteína de soja y con otro tipo de proteína vegetal tras 8 semanas de tratamiento (39). Markova et al. en un estudio randomizado con 37 personas diabéticas sometidas a dietas altas en proteína animal o vegetal durante 6 semanas encontraron mejoras en varios parámetros relacionados con la sensibilidad a la insulina y con la pérdida de peso y los biomarcadores lipídicos sanguíneos, pero sin diferencias entre ambos tratamientos (40).

Otros estudios, algo más antiguos, sí que muestran algunas evidencias de efectos positivos de la proteína vegetal en pacientes con diabetes (41–44).

**Enfermedad renal.** Una enfermedad en la que la ingesta proteica tiene importancia es la enfermedad renal. Los últimos estudios epidemiológicos muestran que la función renal se ve afectada no solo por la cantidad de proteína sino también por el tipo de proteína ingerida (45). En este sentido, el Estudio de Cohorte sobre Insuficiencia Renal Crónica indica que existe una asociación entre el consumo de proteína vegetal y la reducción de factores de riesgo metabólico para la enfermedad crónica renal (46). Hay otros estudios que apuntan también a que una dieta a base de vegetales y en concreto con proteína vegetal, como por ejemplo la proteína de soja, tienen efectos positivos en la función renal (47–49).

**Cáncer.** No hay apenas estudios sobre la posible relación entre consumo de proteína vegetal y disminución de riesgo de cáncer.

**Alergias alimentarias.** Hay que señalar que todas las proteínas alimentarias tienen el potencial de desarrollar alergias, siendo más sensible a esta problemática la población infantil que la adulta, de ahí la importancia de ir incluyendo durante los primeros años de vida una alimentación variada que puede prevenir algunos de los posibles problemas alérgicos fundamentalmente por adaptación de la microbiota intestinal (50). Sin embargo, no siempre esta adaptación es posible y hay personas vulnerables a determinados componentes de los alimentos.

Actualmente se conocen alergias e intolerancias a las proteínas del trigo y soja. También hay descritos casos de alergias a la proteína de guisante, aunque esta última no se considera como alérgeno para ser informado en las etiquetas de los alimentos (alérgeno escondido). En cualquier caso, dada la gran diversidad de respuesta del sistema inmunitario de cada persona y de los múltiples factores implicados en las mismas, es difícil predecir el impacto sobre el desarrollo de alergias alimentarias de la inclusión de un determinado ingrediente o alimento en la dieta.

## 5. PRODUCTOS ALTERNATIVOS A BASE DE PROTEÍNA VEGETAL

El interés de las proteínas vegetales como alternativa a la proteína animal en la dieta a base de desarrollar alimentos que simulen a los originales de los sectores de la carne, los lácteos o del pescado resulta innegable.

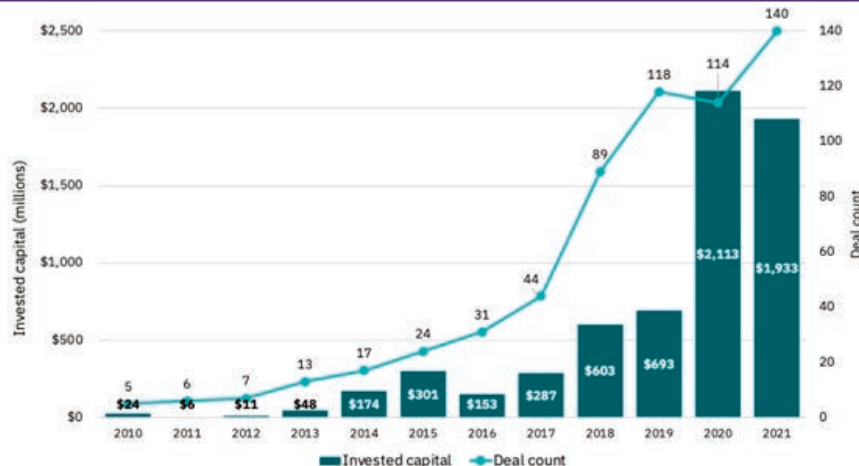
Las ventas de productos basados en proteína vegetal en el mercado de USA en el año 2021 creció tres veces más rápido que el total de ventas en alimentación alcanzando 7.4 billones de dólares. En concreto en el sector de productos análogos a la carne las ventas en 2021 en USA fueron de 1,4 billones de dólares mientras que en el sector de lácteos alcanzaron los 2,68 billones de dólares (6). El mercado mundial de proteínas de origen vegetal se estima en 12.2 billones en 2022 y en 17.4 billones para 2027 (51) (*Market & Market*, 2022).

Según el GFI (*Global Food Institute*) en 2021 había un total de 668 compañías dedicadas a la producción de alimentos alternativos elaborados con vegetales, de las que 292 están situadas en EU, 239 en USA y el resto en América del Sur (40), Asia (82) y Australia (15) (52).

En la Figura 1 se representa la evolución de las inversiones en los últimos 11 años en este sector. Tal y como se puede observar, el desarrollo del sector ha sido exponencial alcanzando en los últimos dos años unas cifras significativas (entorno a 1000 M\$). La Figura 2 muestra los principales países donde se acumula la inversión, siendo Estados Unidos quien acapara el mayor porcentaje.

Uno de los sectores más importantes en esta tendencia de los productos alternativos es el de la carne. En un trabajo reciente sobre la industria cárnica en Canadá y la repercusión de los análogos de la carne (53) se señala que, según los datos oficiales, aunque todavía las ventas de este tipo de análogos es del orden del 0,9% del sector, su crecimiento está siendo mucho mayor que el de los productos tradicionales estimándose en un 8,3% en el periodo 2014 a 2023. Este mismo trabajo señala que el 22-34% de los canadienses piensan en reducir su ingesta de carne, siendo los principales motivos la salud, el impacto medioambiental el precio y el bienestar animal, factores que son comunes a los analizados en otros estudios. Además, se ha visto que en personas por encima de los 45 años el factor prioritario es la salud mientras que en los más jóvenes es el impacto medioambiental.

Un aspecto importante en el empleo de proteína vegetal en la reformulación de alimentos o en la preparación de suplementos es que plantea ciertas dificultades desde el punto de vista sensorial y puede resultar un factor que limite la aceptación de los nuevos productos por parte de los consumidores (54). Se han descrito distintos sabores desagradables (amargo, graso, herbal, leguminoso, astringente), consecuencia de la presencia de compuestos volátiles (alde-



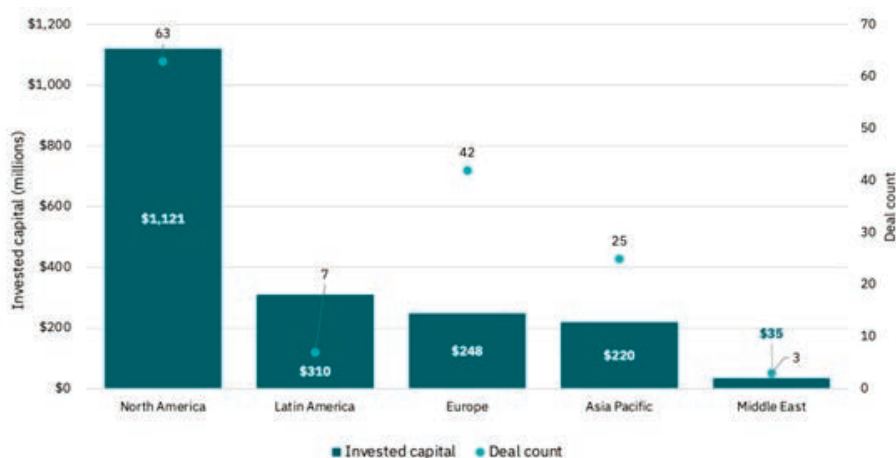
Source: GFI analysis of data from PitchBook Data, Inc.  
Note: Data has not been reviewed by PitchBook analysts.

Figura 1. Inversión global en empresas relacionadas con productos a base de vegetales (periodo 2010-2021) (6) (Fuente GFI, 2021).

hídos, cetonas, pirazinas y furanos), y no volátiles (péptidos, alcaloides, compuestos fenólicos) que pueden ser minimizados con algunas estrategias tecnológicas (54).

Es importante señalar que los productos que existen actualmente en el mercado a base de proteína vegetal no siempre responden a un perfil nutricional mucho mejor que los productos tradicionales elaborados con ingredientes de origen animal. McClements (55) comparando el perfil nutricional de *burgers* vegetales con los convencionales de la misma marca observaron que presentaban igual cantidad de proteína, menor aporte de calorías, grasa y colesterol, pero mayores cantidades de carbohidratos, azúcares y sal. En un estudio comparativo de la composición nutricional actual de los productos análogos a la carne y los productos tradicionales (56) se concluye que, en general, los nuevos productos responden a la clasificación de alimentos ultraprocesados (con un listado de más de 20

ingredientes en la mayoría de los casos) y por otro lado su perfil nutricional respondería al de los alimentos que pretenden simular. Mientras que platos vegetarianos tradicionales requieren cantidades mínimas de aceite y sal en su preparación, las nuevas alternativas vegetales sustitutivas de productos cárnicos se comercializan en forma de hamburguesas, salchichas, o *nuggets*, que requieren frituras, y que se suelen acompañar de alimentos de escasa calidad nutricional. Las dietas basadas en estos nuevos reformulados pueden llegar a ser deficientes en calcio, potasio, magnesio, zinc y vitamina B12, mientras que exceden las ingestas recomendadas de grasa saturada, sodio y azúcar (57). Se hace evidente por tanto necesidad de informar adecuadamente a los consumidores y asegurar que, si reducen el consumo de alimentos de origen animal, escojan alternativas que eviten una disminución no intencionada de micronutrientes en la dieta, y se satisfagan las recomendaciones nutricionales (58).



Source: GFI analysis of data from PitchBook Data, Inc.  
Note: Data has not been reviewed by PitchBook analysts. North America includes Canada and the United States only. Latin America includes Mexico, South America, and Central America.

Figura 2. Inversión por regiones en empresas relacionadas con productos a base de proteína vegetal. (Fuente: GFI, 2021) (6)



En definitiva, subsiste el reto de mejorar las formulaciones de los nuevos productos que se generan como alternativa de productos de origen animal para que, además de cumplir con la expectativa de constituir una adecuada fuente proteica en la dieta, supongan una mejora global del aporte del resto de nutrientes y compuestos desde el punto de vista saludable.

## 6. ASPECTOS REGULATORIOS

Desde el punto de vista legislativo apenas se han desarrollado normativas expresas sobre la producción o comercialización de productos vegetales alternativos a alimentos de origen animal. En la Unión Europea solo cabe destacar la prohibición expresa a partir de enero de 2021 de denominar a productos vegetales alternativos a los lácteos (leche, yogures, quesos) con denominaciones que evoquen a un origen lácteo (basada en el Reglamento 1308/2013). Sin embargo, por el momento, esta prohibición no es extensiva a productos que sean alternativos en el sector de la carne o del pescado. En Estados Unidos, la Asociación de Alimentos elaborados con Plantas - *Plant Based Food Association* (PBFA) desarrolló unos estándares para la denominación de productos alternativos a los elaborados con carne (59). Además, esta Asociación junto con la NSF (*National Sanitation Foundation*) en Estados Unidos desarrollaron una certificación de productos alternativos para avalar su origen vegetal que puede utilizarse de forma voluntaria en los etiquetados ayudando a promocionar este tipo de alimentos.

Sin embargo, a medio-largo plazo los organismos reguladores nacionales e internacionales deberían establecer unos estándares que permitan etiquetar apropiadamente los productos alternativos a base de plantas para evitar la confusión de los consumidores. Esta regulación ayudaría al desarrollo de este tipo de industrias y sobre todo ayudarían al consumidor a elegir una dieta más saludable y sostenible (52). En enero de 2022 la FDA anunció que se disponía a trabajar sobre la regulación del etiquetado de estos productos (6).

## 7. CONCLUSIONES

Las proteínas vegetales convenientemente modificadas pueden constituir una alternativa adecuada desde el punto de vista tecnológico para el desarrollo de alimentos que emulen en cuanto a sus características texturales a los productos de origen animal presentes tradicionalmente en nuestra cultura gastronómica. Su producción es más respetuosa con el medio ambiente y la sostenibilidad del planeta que la producción animal. Aunque de forma individual pueden presentar algunos déficits en cuanto al aporte de aminoácidos, una buena combinación, diversificación y tratamiento asegura la calidad nutricional.

En comparación con otras alternativas proteicas, como la carne cultivada o los insectos, no provoca ningún tipo de rechazo por parte de la población (más allá de las posibles diferencias sensoriales con el producto original), ni requiere de un desarrollo tecnológico de producción sofisticado. Además, en opinión de los autores, garantiza una actividad rural que es de gran importancia para la economía y el desarrollo de las comunidades. Subsiste en la actualidad el reto de conseguir formulaciones de productos alternativos a los de origen animal a base de proteínas vegetales que siendo sensorialmente excelentes respondan a un perfil nutricional saludable.

## 8. REFERENCIAS

1. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2015. p. 1599–600.
2. Hadi J, Brightwell G. Safety of alternative proteins: Technological, environmental and regulatory aspects of cultured meat, plant-based meat, insect protein and single-cell protein. *Foods*. 2021;10(6).
3. van Dijk M, Morley T, Rau ML, Saghay Y. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nat Food* [Internet]. 2021;2(7):494–501. Available from: <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
4. Onwezen MC, Bouwman EP, Reinders MJ, Dagevos H. A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. *Appetite* [Internet]. 2021;159(November 2020):105058. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.105058>
5. Nestlé I. Observatorio Nestlé sobre Hábitos Nutricionales y Estilos de Vida de las Familias. Informe 2021. 2021; Available from: <https://empresa.nestle.es/es/sala-de-prensa/actualidad-nestle/alimentacion-sostenible>
6. GFI. 2021 State of the Industry Report. Plant-based meat, seafood, eggs and dairy [Internet]. 2021. Available from: <https://gfi.org/resource/plant-based-meat-eggs-and-dairy-state-of-the-industry-report/>
7. Sim SYJ, Srv A, Chiang JH, Henry CJ. Plant proteins for future foods: A roadmap. *Foods*. 2021;10(8):1–31.
8. Akharume FU, Aluko RE, Adedeji AA. Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2021;20(1):198–224.
9. Bou R, Navarro-Vozmediano P, Domínguez R, López-Gómez M, Pinent M, Ribas-Agustí A, et al. Application of emerging technologies to obtain legume protein isolates with improved techno-functional





- properties and health effects. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2022;21(3):2200–32.
10. Philips LG. Structure-function properties of food proteins. Cambridge: Academic Press Inc.; 2013.
11. Langyan S, Yadava P, Khan FN, Dar ZA, Singh R, Kumar A. Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods. *Front Nutr*. 2022;8(January).
12. Mariotti F, Gardner CD. Dietary protein and amino acids in vegetarian diets—A review. *Nutrients*. 2019;11(11):1–19.
13. Day L, Cakebread JA, Loveday SM. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2022;119(December 2021):428–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020>
14. Kumar M, Tomar M, Punia S, Dhakane-Lad J, Dhumal S, Changan S, et al. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. *Lwt* [Internet]. 2022;154(October 2021):112620. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112620>
15. Sá AGA, Moreno YMF, Carciofi BAM. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2020;97(October 2019):170–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
16. FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAQ Expert Consultation. Vol. 92, FAO food and nutrition paper. 2013. 1–66 p.
17. Hertzler SR, Lieblein-Boff JC, Weiler M, Allgeier C. Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. *Nutrients*. 2020;12(12):1–27.
18. Nguyen TTP, Bhandari B, Cichero J, Prakash S. Gastrointestinal digestion of dairy and soy proteins in infant formulas: An in vitro study. *Food Res Int* [Internet]. 2015;76:348–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.030>
19. Sá AGA, Moreno YMF, Carciofi BAM. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019;60(20):3367–86. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688249>
20. Salomé M, De Gavelle E, Dufour A, Dubuisson C, Volatier JL, Fouillet H, et al. Plant-Protein Diversity Is Critical to Ensuring the Nutritional Adequacy of Diets When Replacing Animal with Plant Protein: Observed and Modeled Diets of French Adults (INCA3). *J Nutr*. 2020;150(3):536–45.
21. Rojas Conzuelo Z, Robyr R, Kopf-Bolanz KA. Optimization of Protein Quality of Plant-Based Foods Through Digitalized Product Development. *Front Nutr*. 2022;9(May):1–10.
22. Martineau-Côté D, Achouri A, Karboune S, L'Hocine L. Faba Bean: An Untapped Source of Quality Plant Proteins and Bioactives. *Nutrients*. 2022;14(8):1–27.
23. Alrosan M, Tan TC, Mat Easa A, Gammoh S, Alu'datt MH. Recent updates on lentil and quinoa protein-based dairy protein alternatives: Nutrition, technologies, and challenges. *Food Chem* [Internet]. 2022;383(August 2021):132386. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132386>
24. López DN, Galante M, Robson M, Boeris V, Spelzini D. Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;109:152–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080>
25. Helstad A, Forsén E, Ahlström C, Mayer Labba IC, Sandberg AS, Rayner M, et al. Protein extraction from cold-pressed hempseed press cake: From laboratory to pilot scale. *J Food Sci*. 2022;87(1):312–25.
26. Chmielewska A, Kozłowska M, Rachwał D, Wnukowski P, Amarowicz R, Nebesny E, et al. Canola/rapeseed protein—nutritional value, functionality and food application: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2021;61(22):3836–56. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809342>
27. Kumar M, Tomar M, Punia S, Grasso S, Arrutia F, Choudhary J, et al. Cottonseed: A sustainable contributor to global protein requirements. *Trends Food Sci Technol*. 2021;111(February):100–13.
28. Guan T, Zhang Z, Li X, Cui S, McClements DJ, Wu X, et al. Preparation, Characteristics, and Advantages of Plant Protein-Based Bioactive Molecule Delivery Systems. *Foods* [Internet]. 2022;11(11). Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/11/1562>
29. Gumus CE, Decker EA, McClements DJ. Gastrointestinal fate of emulsion-based  $\omega$ -3 oil delivery systems stabilized by plant proteins: Lentil, pea, and faba bean proteins. *J Food Eng* [Internet]. 2017;207:90–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.019>
30. Colgrave ML, Dominik S, Tobin AB, Stockmann R, Simon C, Howitt CA, et al. Perspectives on Future Protein Production. *J Agric Food Chem*. 2021;69(50):15076–83.
31. Huang J, Liao LM, Weinstein SJ, Sinha R, Graubard BI, Albanes D. Association between Plant and Animal Protein Intake and Overall and Cause-Specific Mortality. *JAMA Intern Med*. 2020;180(9):1173–84.
32. Naghshi S, Sadeghi O, Willett WC, Esmailzadeh A. Dietary intake of total, animal, and plant proteins and risk of all cause, cardiovascular, and cancer mortality: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*. 2020;370.
33. Li SS, Mejia SB, Lytvyn L, Stewart SE, Vigiouliou E, Ha V, et al. Effect of plant protein on blood lipids: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(12).
34. Zhao H, Song A, Zheng C, Wang M, Song G. Effects of plant protein and animal protein on lipid profile, body weight and body mass index on patients with hypercholesterolemia: a systematic review

- and meta-analysis. *Acta Diabetol.* 2020 Oct;57(10):1169–80.
35. Lin Y, Mouratidou T, Vereecken C, Kersting M, Bolca S, De Moraes ACF, et al. Dietary animal and plant protein intakes and their associations with obesity and cardio-metabolic indicators in European adolescents: The HELENA cross-sectional study. *Nutr J.* 2015;14(1):1–11.
36. Campbell WW. Animal-based and plant-based protein-rich foods and cardiovascular health: a complex conundrum. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(1):8–9.
37. Bergeron N, Chiu S, Williams PT, M King S, Krauss RM. Effects of red meat, white meat, and nonmeat protein sources on atherogenic lipoprotein measures in the context of low compared with high saturated fat intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(1):24–33.
38. Wang Y, Hill ER, Campbell WW, O'Connor LE. Plant- and Animal-Based Protein-Rich Foods and Cardiovascular Health. *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. 2022;24(4):197–213. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11883-022-01003-z>
39. Hassanzadeh-Rostami Z, Hemmatdar Z, Pishdad GR, Faghih S. Moderate Consumption of Red Meat, Compared to Soy or Non-Soy Legume, Has No Adverse Effect on Cardio-Metabolic Factors in Patients with Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol diabetes Off journal, Ger Soc Endocrinol [and] Ger Diabetes Assoc.* 2021 Jun;129(6):429–37.
40. Markova M, Koelman L, Hornemann S, Pivovarova O, Sucher S, Machann J, et al. Effects of plant and animal high protein diets on immune-inflammatory biomarkers: A 6-week intervention trial. *Clin Nutr* [Internet]. 2020;39(3):862–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.03.019>
41. Malik VS, Li Y, Tobias DK, Pan A, Hu FB. Dietary Protein Intake and Risk of Type 2 Diabetes in US Men and Women. *Am J Epidemiol.* 2016;183(8):715–28.
42. Smith CE, Mollard RC, Luhovyy BL, Harvey Anderson G. The effect of yellow pea protein and fibre on short-term food intake, subjective appetite and glycaemic response in healthy young men. *Br J Nutr.* 2012;108(SUPPL. 1):74–80.
43. König D, Muser K, Berg A, Deibert P. Fuel selection and appetite-regulating hormones after intake of a soy protein-based meal replacement. *Nutrition.* 2012;28(1):35–9.
44. Viguiouk E, Stewart SE, Jayalath VH, Ng AP, Mirrahimi A, de Souza RJ, et al. Effect of replacing animal protein with plant protein on glycemic control in diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients.* 2015;7(12):9804–24.
45. Bernier-Jean A, Prince RL, Lewis JR, Craig JC, Hodgson JM, Lim WH, et al. Dietary plant and animal protein intake and decline in estimated glomerular filtration rate among elderly women: a 10-year longitudinal cohort study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2021 Aug;36(9):1640–7.
46. Scialla JJ, Appel LJ, Wolf M, Yang W, Zhang X, Sozio SM, et al. Plant protein intake is associated with fibroblast growth factor 23 and serum bicarbonate levels in patients with chronic kidney disease: the Chronic Renal Insufficiency Cohort study. *J Ren Nutr Off J Council Ren Nutr Natl Kidney Found.* 2012 Jul;22(4):379–388.e1.
47. Goraya N, Simoni J, Jo C-H, Wesson DE. A comparison of treating metabolic acidosis in CKD stage 4 hypertensive kidney disease with fruits and vegetables or sodium bicarbonate. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013 Mar;8(3):371–81.
48. Moe SM, Zidehsarai MP, Chambers MA, Jackman LA, Radcliffe JS, Trevino LL, et al. Vegetarian compared with meat dietary protein source and phosphorus homeostasis in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Feb;6(2):257–64.
49. Kubota M, Watanabe R, Yamaguchi M, Hosojima M, Saito A, Fujii M, et al. Rice endosperm protein slows progression of fatty liver and diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Nutr.* 2016 Oct;116(8):1326–35.
50. Skypala IJ, McKenzie R. Nutritional Issues in Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019 Oct;57(2):166–78.
51. Markets & Markets. Plant-based protein market report [Internet]. 2022. Available from: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-based-protein-market-14715651.html>
52. Sridhar K, Bouhallab S, Croguennec T, Renard D, Lechevalier V. Recent trends in design of healthier plant-based alternatives: nutritional profile, gastrointestinal digestion, and consumer perception. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2022;0(0):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2081666>
53. Ngapo TM. Meat analogues, the Canadian Meat Industry and the Canadian consumer. *Meat Sci* [Internet]. 2022;191(May):108846. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108846>
54. Leonard W, Zhang P, Ying D, Fang Z. Surmounting the off-flavor challenge in plant-based foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2022;0(0):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2078275>
55. McClements DJ. Future foods: Is it possible to design a healthier and more sustainable food supply? *Nutr Bull.* 2020;45(3):341–54.
56. Bohrer BM. An investigation of the formulation and nutritional composition of modern meat analogue products. *Food Sci Hum Wellness.* 2019;8(4):320–9.
57. Tso R, Forde CG. Unintended consequences: Nutritional impact and potential pitfalls of switching from animal- to plant-based foods. *Nutrients.* 2021;13(8):1–16.
58. Ložnjak Švarc P, Jensen MB, Langwagen M, Poulsen A, Trolle E, Jakobsen J. Nutrient content in plant-based protein products intended for food composition databases. *J Food Compos Anal.* 2022;106(December 2021).



59. NSF-PBFA. NSF-PBFA. [Internet]. Available from: <https://www.nsf.org/testing/food/food-beverage-product-certification/plant-based-certification>
60. Hall AE, Moraru CI. Effect of High Pressure Processing and heat treatment on in vitro digestibility and trypsin inhibitor activity in lentil and faba bean protein concentrates. *Lwt.* 2021;152(April):112342.
61. Sim SYJ, Karwe M V., Moraru CI. High pressure structuring of pea protein concentrates. *J Food Process Eng.* 2019;42(7):1–11.
62. Al-Ruwaih N, Ahmed J, Mulla MF, Arfat YA. High-pressure assisted enzymatic proteolysis of kidney beans protein isolates and characterization of hydrolysates by functional, structural, rheological and antioxidant properties. *Lwt.* 2019;100(August 2018):231–6.
63. Mir NA, Riar CS, Singh S. Improvement in the functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) protein isolates after the application of controlled heat-treatment: Effect on structural properties. *Food Struct.* 2021;28(April):100189.
64. Peng W, Kong X, Chen Y, Zhang C, Yang Y, Hua Y. Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocoll.* 2016;52:301–10.
65. Martínez-Velasco A, Lobato-Calleros C, Hernández-Rodríguez BE, Román-Guerrero A, Alvarez-Ramirez J, Vernon-Carter EJ. High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrason Sonochem.* 2018;44(January):97–105.
66. Nazari B, Mohammadifar MA, Shojaei-Aliabadi S, Feizollahi E, Mirmoghtadaie L. Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrason Sonochem.* 2018;41(November 2016):382–8.
67. Ji H, Dong S, Han F, Li Y, Chen G, Li L, et al. Effects of Dielectric Barrier Discharge (DBD) Cold Plasma Treatment on Physicochemical and Functional Properties of Peanut Protein. *Food Bioprocess Technol.* 2018;11(2):344–54.
68. Chen L, Chen J, Yu L, Wu K, Zhao M. Emulsification performance and interfacial properties of enzymically hydrolyzed peanut protein isolate pretreated by extrusion cooking. *Food Hydrocoll.* 2018;77:607–16.
69. Xing Q, Dekker S, Kyriakopoulou K, Boom RM, Smid EJ, Schutyser MAI. Enhanced nutritional value of chickpea protein concentrate by dry separation and solid state fermentation. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2020;59(June 2019):102269.
70. Hu Z, Qiu L, Sun Y, Xiong H, Ogra Y. Improvement of the solubility and emulsifying properties of rice bran protein by phosphorylation with sodium trimetaphosphate. *Food Hydrocoll.* 2019;96(January):288–99.

Si desea citar nuestro artículo:

**Aspectos funcionales, nutricionales, saludables y comerciales de proteínas vegetales como alternativa para análogos de productos cárnicos: Revisión**

Iciar Astiasarán; Larisa Giura; Diana Ansorena

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. n.º extra (2022) · pp. 543-554

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.20>

# EL SECTOR AGROALIMENTARIO ESPAÑOL DENTRO DE UN MUNDO GLOBALIZADO

## THE SPANISH AGRI-FOOD SECTOR IN A GLOBALISED WORLD

**M<sup>a</sup> Victoria Castillo Ruiz-Cabello<sup>2</sup>, Elena Cebadera Miranda<sup>2</sup>, Montaña Cámara Hurtado<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Académica correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Pza. de Ramón y Cajal s.n., UCM, 28040 Madrid.

**corresponding author:** mcamara@farm.ucm.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

La globalización, si bien es un proceso complejo de definir, se suele describir por su rasgo fundamental, que es la integración progresiva de las economías y las sociedades. Durante la tercera ola del fenómeno de globalización (a partir de 1945), el sistema alimentario mundial experimentó una profunda transformación que desembocó en dos procesos paralelos: la homogeneización de la alimentación o, lo que es equivalente, la globalización de la dieta, y la entrada en la era del riesgo alimentario. Durante el siglo XX el sector agroalimentario español ha experimentado una enorme evolución, entrando en su verdadera internacionalización con la adhesión de España a la Comunidad Económica Europea (CEE) en 1986, que supuso la liberalización de los mercados y la expansión de las exportaciones. Ya en el siglo XXI, distintos movimientos y tendencias internacionales han influido en el modo de apreciar los alimentos por parte de los consumidores, fomentando el desarrollo de una nueva actitud hacia la alimentación, su interés por la salud, el medio ambiente, el bienestar animal, la conveniencia, la proximidad de los puntos de producción, así como nuevas formas de consumo. El sistema agroalimentario mundial tiene que evolucionar hacia un modelo más sostenible, trabajando en la reducción de los impactos negativos de la producción de alimentos, que permitan el acceso a la población a alimentos más sanos y nutritivos, producidos en cantidad suficiente para alimentar a toda la población y con menor repercusión social y ambiental.

#### ABSTRACT

*Its fundamental feature usually describes globalization, which is the progressive integration of economies and societies. During the third wave of the globalization phenomenon (starting in 1945), the world food system underwent a deep transformation that led to two parallel processes: the homogenization of food (the globalization of diet), and the entry into the era of food risk. The Spanish agri-food sector has undergone an enormous evolution during the 20th century. Its true internationalization started with the accession of Spain to the European Economic Community (EEC) in 1986, which led to the liberalization of markets and the expansion of exports. At the 21st century, different international movements and trends have influenced the way consumers appreciate food, promoting the development of a new attitude towards food, moving their interest towards health, the environment, animal well-being, the proximity of production, as well as new forms of consumption. The global agri-food system must evolve towards a more sustainable model. We need to work on the reduction of the negative impacts of food production, and to allow the population the access to healthier and more nutritious food, produced in sufficient quantity to feed the entire population with less social and environmental impact.*

#### Palabras Clave:

globalización  
sistemas agroalimentarios  
seguridad alimentaria  
sostenibilidad

#### Keywords:

globalization  
agri-food systems  
food safety  
sustainability

## 1. INTRODUCCIÓN

La globalización, si bien es un proceso complejo de definir, se suele describir por su rasgo fundamental, que es la integración progresiva de las economías y las sociedades, a la vez que un fenómeno histórico (1). A lo largo de la historia el ser humano se ha desplazado en busca de mejores condiciones de vida, de un mejor acceso a una mayor cantidad y variedad de productos, con el objeto de absorber y difundir nuevas técnicas, ideas y conocimientos (2).

Se puede considerar que en los últimos 500 años se han ido sucediendo tres diferentes etapas en el proceso de globalización, lo que se conoce como las tres fases de la globalización.

Durante la etapa histórica coincidente con la tercera ola del fenómeno de globalización, el sistema alimentario ha experimentado una profunda transformación que dio comienzo en 1944 con la institución de la Conferencia de Naciones Unidas sobre Organización Internacional (embrión de la Organización de Naciones Unidas) y organismos especializados como la *Organización para la Agricultura y la Alimentación* (FAO) o la *Organización Mundial de la Salud* (OMS), esta última en 1948. Además, la sociedad sufrió importantes transformaciones económicas, demográficas, sociales y culturales, que guardaban una estrecha relación con las transformaciones de los comportamientos alimentarios. Estas transformaciones sociales se acentuaron durante el resto del siglo XX (3). La liberalización de los mercados mundiales permitió una importante inyección de fondos a la agricultura, lo que implicó el aumento de la productividad agrícola, que propició la industrialización de la producción y la necesidad de desarrollar la distribución de alimentos, lo que a su vez supuso una profunda transición nutricional a nivel

planetario, que desembocó en la homogeneización de la alimentación o, lo que es equivalente, la globalización de la dieta y la mundialización de la cocina. Con la evolución de la producción y la distribución alimentarias se ha perdido progresivamente todo contacto con el ciclo de producción de los alimentos, es decir, con su origen real.

Con este desarrollo, alimentar a la población ha pasado de ser uno de los objetivos de las organizaciones sociales, para ser considerado un derecho, como queda recogido en el artículo 25.1 de la Declaración Universal de los Derechos Humanos en 1948 (4), que indica: "Todo el mundo tiene derecho a un estándar de vida adecuado para su propia salud y bienestar y el de su familia, incluyendo la alimentación". Por su lado, en la Cumbre Mundial de la Alimentación de 2006, la FAO incorporó un nuevo matiz: "La Seguridad Alimentaria, a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana" (5).

Esto se ha conseguido gracias a las mejoras en los procesos de industrialización que han permitido que la alimentación sea más variada que antes, y también más saludable en términos nutricionales, al permitir un aporte adecuado de vitaminas y oligoelementos. Pero al mismo tiempo, algunos grupos poblacionales pecan de sobrealimentación, lo que lleva a la aparición de obesidad y otras enfermedades crónicas.

Por otro lado, el proceso de globalización genera recelos, algunos consumidores perciben las mejoras en la tecnología alimentaria, tanto las transformaciones químicas como las biotecnológicas,



Figura 1.- Las tres fases de la globalización



lógicas, como un instrumento al servicio del productor, del transportista o del vendedor y, no precisamente, para aumentar la calidad nutricional de los alimentos (6).

En los últimos años, la irrupción del SARS-Cov2 y la pandemia resultante de COVID-19 en marzo de 2020, y la posterior invasión de Ucrania por la Federación Rusa han supuesto grandes cambios en el comercio internacional y una disrupción en los planteamientos de las cadenas globales de valor, ya que antes las decisiones se tomaban basándose casi exclusivamente en motivos económicos, mientras que ahora se han de considerar razones de seguridad nacional, salud pública y geopolítica (7). Tras esta situación, es imprescindible realizar una reevaluación estratégica de los bienes esenciales, para asegurar su producción nacional y reducir así la dependencia de terceros países, especialmente en lo relativo a materias primas y alimentos procesados.

## 2. EVOLUCIÓN DEL SECTOR AGROALIMENTARIO EN ESPAÑA

Durante el siglo XX, se produjeron enormes transformaciones tanto en el patrón de consumo de alimentos de la población española como en la articulación del sector agroalimentario en su conjunto. Desde la segunda mitad del siglo XX, el sector agroalimentario español se ha enfrentado a una creciente internacionalización, unida al desarrollo y modernización de la distribución alimentaria y al cambio en el patrón de consumo de alimentos. Estos cambios se enmarcan en un periodo histórico en el que España experimenta una gran transformación, pasando de las enormes carstías de la posguerra civil a la entrada en la Comunidad Europea.

A principios del siglo XX, la dieta de la población se basaba en el patrón mediterráneo, un consumo mayoritario de cereales, leguminosas, frutas y hortalizas, utilizando el pescado como fuente de proteína animal, y el aceite de oliva como fuente de grasa. En los años anteriores a la Guerra Civil, el consumo de productos derivados de la ganadería (lácteos en general, pollo, porcino y vacuno) era escaso y el nivel de consumo alimentario de la población española era inferior al de los países europeos de su entorno (8, 9).

Durante el primer tercio del siglo XX, la implantación en España de nuevas técnicas agrícolas (riego, rotaciones, mecanización) y abonos inorgánicos, mejoraron sustantivamente la productividad agraria, por lo que la población se benefició de una mayor disponibilidad de productos de origen vegetal como aceite de oliva y azúcar. Todo ello supuso un aumento de las kilocalorías per cápita, unido a la introducción de proteínas de origen animal en la dieta, fundamentalmente de carne de cerdo y productos lácteos.

La verdadera internacionalización del sector agroalimentario español se produjo con la adhesión de España a la Comunidad Económica Europea en 1986, que condujo a la liberalización de los mercados y, consiguientemente, a una expansión de las exportaciones. La Política Agraria Común supuso el paso de una política nacional a una dependencia de los acuerdos europeos con el objeto de determinar el volumen de producción del sector agrario, del que tradicionalmente ha dependido la industria alimentaria española.

Además, con la entrada de España en la UE, se produjo una mayor interacción de la economía española con el resto de Europa, lo que fomentó la llegada de capital extranjero que ha ido instalando paulatinamente sus propios sistemas de distribución e infraestructuras en nuestro país. El grado de desarrollo y madurez de la industria alimentaria en Europa era muy superior al que existía en España, de ahí que España fuera percibida como un país netamente perceptor de la inversión extranjera, siendo la industria alimentaria una de las industrias manufactureras que recibió a finales de la década de 1980 mayor volumen de inversiones extranjeras, después de la industria de productos químicos. A mediados de los años 90 del siglo pasado, hubo un notable proceso de adquisición de empresas nacionales por capital internacional, sobre todo en la producción de aceite y leche. Multinacionales emblemáticas como Nestlé, Unilever, Nabisco, Kraft Jacobs, Guinness y Danone adquirieron empresas españolas.

## 3. EL SECTOR AGROALIMENTARIO ESPAÑOL EN EL SIGLO XXI

La recesión económica que comenzó en 2008 ha impulsado a la industria alimentaria española a volcarse en la exportación, creciendo y obteniendo una balanza comercial positiva durante varios años consecutivos. Las exportaciones agroalimentarias españolas de productos transformados en 2021 alcanzaron un valor de 37.821 millones de euros, y las importaciones de 25.125 millones de euros respectivamente (10). La tasa de apertura, indicador del grado de internacionalización de la economía y que representa el peso del sector exterior en la riqueza de un país, del sector agroalimentario es casi tres veces superior a la del total de la economía española, situándose en 2018, último año del que se dispone de datos, en el 73.6%. Actualmente, las exportaciones de este sector suponen casi el 14% del valor de las ventas de la industria española en su conjunto, que también ha experimentado un importante crecimiento en el mismo periodo (11). El comercio exterior del sector recuperó la tendencia de crecimiento mantenida hasta 2019, superando la contracción del crecimiento de las exportaciones provocada por el cierre de la hostelería y la restauración durante varios periodos de la pandemia de COVID-19.



En el conjunto de la Unión Europea, la industria alimentaria española ocupa el cuarto puesto en exportaciones (11), tras Países Bajos, Alemania y Francia, y por delante de Italia y Bélgica, y el octavo a nivel mundial (12), alcanzando los 38.202 millones de euros exportados en 2021 y manteniendo un saldo comercial positivo de 13.314 millones. Considerando el valor de los productos exportados, los subsectores que más aportaron al total durante 2021 fueron la industria cárnica seguida de los subsectores del aceite de oliva y del vino. Los países de la Unión Europea son nuestros principales socios comerciales, particularmente, Francia ocupa el primer lugar (14,1% en 2021) seguida de Italia (11%) y Portugal (10,2%) como países receptores de productos españoles (11). El escenario que afronta la industria alimentaria española en 2022 se ha complicado con la invasión de Ucrania, y desde el sector se aboga por implantar medidas que permitan garantizar el funcionamiento de la cadena alimentaria para abastecer de alimentos y bebidas al conjunto de la población.

### 3.1 Patrón de consumo de alimentos y comportamiento del consumidor

La decisión de compra de alimentos y bebidas viene determinada por el tamaño de la población de residencia, el número de personas que componen el hogar, el nivel socioeconómico, la presencia no o de niños en la familia, la situación en el mercado laboral del encargado de realizar las compras o la edad de éste. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación organiza los Paneles de Consumo Alimentario anuales, que estudian también las variables sociodemográficas que influyen en el consumo de la población española (13).

Desde 2015 el número de hogares en España viene experimentando una tendencia creciente, puesto que incrementa significativamente el número de hogares de menor tamaño y de los hogares unipersonales formados por un joven o por un adulto independiente. La llegada de población inmigrante desde los primeros años del siglo XXI y la salida posterior de parte de esta misma población en los años siguientes a la crisis de 2008 influyeron notablemente en el consumo alimentario. Nuestro país ha ido recuperando población de forma que, desde 2010 hasta 2022 la población ha aumentado casi un 1%, pasando de 47.021.031 individuos a 47.432.805 (14).

En las dos últimas décadas, la evolución del consumo de alimentos ha venido de la mano de varios aspectos fundamentales. El primero de ellos es la disminución del gasto de alimentación en el gasto total de los hogares, que ha pasado de ser alrededor del 30% a mediados de los 80, al 15% en la actualidad (15). La can-

tidad de alimentos consumidos se ha mantenido constante, con tendencia a la baja, aunque el gasto en alimentación en términos absolutos haya aumentado. Esto indica una mayor demanda de productos con mayor valor añadido o mayor calidad. La cantidad de productos considerados con mayor contenido energético o menos saludables es la que más ha disminuido, mientras que el consumo de alimentos fuera del hogar ha aumentado, llegando casi al 22,3% en 2020. El valor y el reparto del gasto marca notables diferencias con respecto a ejercicios anteriores, motivado por la especial situación debida al COVID-19 (16).

Otro aspecto para tener en cuenta en la cuantificación del consumo es la evolución experimentada por los precios, que se refleja en el índice de precios de consumo (IPC), tanto general como del grupo de alimentos y bebidas no alcohólicas. Desde el 2015, el IPC de alimentos y bebidas no alcohólicas mantiene un crecimiento anual continuo, llegando a un máximo en diciembre de 2021, con un aumento de 10,3% en relación con el año 2015 (15).

El gasto en alimentos y bebidas es dispar por comunidades autónomas, con un promedio nacional en 2020 de 1506,9 euros per cápita. Este promedio se ve claramente excedido en el Cataluña, País Vasco, Baleares, Galicia y Navarra, mientras que sucede lo contrario en Extremadura, Andalucía, Castilla-La Mancha y Canarias (16).

Pero el cambio más importante se ha producido en el patrón de comportamiento de los consumidores. Por un lado, ha aparecido una globalización de los patrones de consumo y por otro una diferenciación de los consumidores en segmentos con perfiles más definidos y diversos. El consumidor ahora es más entendido y exigente, dedica más tiempo a la compra, que se ha convertido en un entretenimiento esporádico. Por otro lado, hay que considerar el aumento de las compras por Internet.

### 3.2 La sociedad del riesgo y los riesgos alimentarios

En los inicios del presente siglo XXI, el premio Nobel Joseph Stiglitz en su obra *El malestar en la globalización* (17) denunciaba cómo el potencial generador de riqueza de la liberalización comercial se disipaba a causa de una gestión al servicio de los intereses de unos pocos en detrimento de los del conjunto de la población mundial. La enorme interconexión de la sociedad actual, por la que el tiempo transcurrido desde que ocurre un hecho en un punto del globo hasta que se conoce en el resto de lugares del planeta es de minutos, ha traído como consecuencia la entrada en la *era del riesgo alimentario* inaugurada por el Ministro de Sanidad británico que, en marzo de 1996, anunció en la Cámara de los Comunes la alta probabilidad del vínculo entre la nueva forma de la enfermedad



humana de Creutzfeldt-Jakob y la exposición al agente patógeno de la encefalopatía espongiforme bovina, más conocida bajo el nombre de la enfermedad de las "vacas locas", que tuvo un enorme impacto social y económico en Europa.

La globalización económica ha supuesto que las crisis alimentarias hayan dejado de ser locales para convertirse en internacionales, lo que se ha puesto igualmente de manifiesto con las sucesivas crisis alimentarias posteriores a la de las "vacas locas", como la de la fiebre aftosa, la peste porcina africana, la de la presencia de acrilamidas en alimentación animal, etc. Estos temas llevaron a la creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en enero de 2002, como parte del desarrollo del Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea (18). La EFSA fue creada, mediante el Reglamento (CE) N° 178/2002, como una fuente independiente de asesoramiento científico y técnico sobre alimentos y piensos, con funciones de evaluación y comunicación de riesgos a lo largo de toda la cadena alimentaria (19).

En el ámbito alimentario, la definición del riesgo que da el Reglamento 178/2002 es similar a la utilizada por el *Codex Alimentarius* a nivel internacional (19, 20): "*la ponderación de la probabilidad de un efecto perjudicial para la salud y de la gravedad de ese efecto, como consecuencia de un factor de peligro*"; el *Codex Alimentarius*, por su parte, define peligro como "*agente biológico, químico o físico presente en el alimento, o una propiedad de éste, que puede provocar un efecto nocivo para la salud*".

Desde finales de la década de 1990, se han realizado numerosos estudios (21, 22, 23) con el objetivo de analizar la percepción social de la seguridad alimentaria. La mayor parte de estos estudios tratan de dar respuesta al aumento de la percepción negativa que tiene la población sobre determinadas aplicaciones tecnológicas a la producción de alimentos y la alimentación industrial. Esta percepción resulta sorprendente porque nunca una sociedad había podido disponer de alimentos con tanta abundancia y con tanta seguridad para su consumo.

La sociología y la antropología han ido elaborando dos diferentes enfoques teóricos sobre el concepto de riesgo (3). Para los teóricos de la *sociedad del riesgo*, la causa principal de la creciente intensificación de la ansiedad en torno a la salud o el medio ambiente tiene que ver con algunos de los efectos negativos de la modernización y de la industrialización intensiva (24). Para este grupo, la industria alimentaria es percibida como un enorme negocio agroalimentario, subrayando su dimensión empresarial para la que lo único importante es el beneficio, aunque sea en detrimento de la seguridad alimentaria y de la calidad. Para los defensores de

la *teoría cultural*, lo relevante es entender por qué unos determinados fenómenos son susceptibles de convertirse en problemas frente a otros que no lo hacen (25). El riesgo es una construcción social, lo que para unas sociedades es fuente de temor e incertidumbre, para otras no lo es necesariamente. Por tanto, desde esta perspectiva teórica, a cada cultura, sus riesgos.

La seguridad alimentaria es un área científica donde la ciudadanía juega un papel importante y, por tanto, debe ser vista como parte de la alfabetización o cultura científica de una población, permitiendo que las personas adquieran esta alfabetización funcional, esta capacidad de tomar decisiones informadas (26, 27).

De acuerdo con Cámara y colaboradores (2021), una persona con conocimientos científicos en relación con los problemas alimentarios podría definirse como aquella que es capaz de (i) aplicar conceptos, procedimientos y valores científicos en su vida cotidiana y en las decisiones de compra y consumo de alimentos; (ii) comprender y apreciar el gran poder que la sociedad puede tener para controlar la ciencia y la tecnología con la ayuda de los recursos, así como la utilidad de la ciencia para mejorar el bienestar humano; (iii) reconocer fuentes fiables de información científica y tecnológica y tenerlas en cuenta en la toma de decisiones (26). Las instituciones, organismos y profesionales de la seguridad alimentaria deberían tener como objetivo conseguir que la ciudadanía adquiriese una cultura científica suficiente como para ser capaz de tomar decisiones informadas respecto a los alimentos que consume. Sin embargo, las políticas parecen dirigirse a consumidores ideales, formados y con conocimientos en seguridad alimentaria, mientras que los resultados indican que, al menos en el caso de España, este consumidor ideal es inexistente en los rangos medios de la población (28).

Los debates acerca de los riesgos asociados con el consumo de alimentos no solo se centran en la seguridad química o microbiológica de los mismos, que incide en la salud humana, sino que también abarcan conceptos mucho más amplios que tienen que ver con el medioambiente, el bienestar animal, la economía, y los estilos de vida. Esto hace que los riesgos de la cadena alimentaria sean asuntos complejos y que distintos grupos de interés se impliquen en la identificación, apreciación y expresión de los mismos (29).

Los ciudadanos y, en su nombre, sus políticos elegidos, deben tomar decisiones que requieren una cuidadosa evaluación de los beneficios y riesgos que suponen las oportunidades tecnológicas. A veces estas decisiones se realizan bajo una gran incertidumbre y sin suficiente conocimiento científico (30). Actualmente el análisis de riesgo en materia de seguridad se está utilizando en situaciones para las que no fue diseñado. Nos encontramos en situaciones en las que los hechos son inciertos, los valores están en



disputa y las evaluaciones están integradas en acuerdos de poder controvertidos, con consecuencias heterogéneas para las diversas partes interesadas en todo el mundo.

Además, a los gestores de los sistemas agroalimentarios se les requiere que justifiquen sus actividades incluyendo consideraciones relacionadas con el cambio climático, ambientales, sostenibilidad, erradicación de la pobreza y el hambre, desastres naturales, así como las amenazas que plantean los movimientos de plagas y enfermedades (31). Las cuestiones para las que los responsables de la formulación de políticas necesitan más aportaciones científicas son aquellos para las que la ciencia es a menudo la más compleja, multidisciplinar e incompleta (32). Todo esto nos hace considerar que para la adecuada caracterización y gestión de los riesgos relacionados con la seguridad alimentaria debemos replantear el análisis del riesgo dentro de las características de la ciencia posnormal (33). Este enfoque ya se debate a nivel de la EFSA y en el seno de la Comisión del *Codex Alimentarius*.

#### **4. EL RETO: ALIMENTACIÓN SEGURA, SALUDABLE Y SOSTENIBLE**

Distintos movimientos y tendencias internacionales han influido en el modo de apreciar los alimentos por parte de los consumidores, que han desarrollado una nueva actitud hacia la alimentación, y ahora es entendida no como una necesidad básica, sino como una percepción en la que se combina el reconocimiento social y un fuerte componente gastronómico. Además, el impacto de las crisis alimentarias ha supuesto un replanteamiento de la gestión del riesgo en la industria alimentaria. Las autoridades sanitarias, cada una de ellas en su ámbito regulatorio, han continuado implantando requisitos para la industria alimentaria, con la finalidad de informar adecuadamente al consumidor y capacitarle para que tome decisiones informadas.

El consumidor actual está preocupado con todo lo relacionado con la salud, el medio ambiente, el bienestar animal, la conveniencia, la proximidad de los puntos de producción, así como nuevas formas de consumo (34, 35). También está interesado en disponer en el mercado de nuevos alimentos que cumplan mayores funcionalidades y proporcionen más beneficios para la salud. Dentro de este grupo cabe considerar la producción de alimentos funcionales y nutracéuticos (36). Las instituciones y las administraciones actúan como garantes y promotores de esta tendencia. Sirva como referencia la entrada en vigor del Reglamento 1169/2011, de información alimentaria al consumidor, en el que se obliga al operador alimentario a proporcionar información nutricional y de los

alérgenos que contiene cada producto alimentario (37).

Además de por su salud, los consumidores están preocupados por la seguridad alimentaria, ofrecer productos de calidad ya no es suficiente para un consumidor cada vez más autosuficiente; es necesario que los productores de alimentos garanticen la calidad de sus productos y que informen sobre ella. Los resultados del Eurobarómetro especial sobre Seguridad Alimentaria en la Unión Europea (2022) muestran claramente que un porcentaje muy elevado de ciudadanos europeos (70%) y españoles (81%) están preocupados por la seguridad de los alimentos que consumen, y confían en la existencia de normas que velan por garantizar su inocuidad. También muestran una gran preocupación por los residuos de plaguicidas, los residuos de antibióticos, hormonas o esteroides en la carne y los aditivos como los colorantes, conservantes o aromatizantes utilizados en los alimentos o bebidas. Socio-demográficamente, las mujeres están más interesadas (74%) en cuestiones relacionadas con la seguridad alimentaria que los hombres (67%). Los ciudadanos españoles, a la hora de comprar alimentos, están preocupados mayoritariamente por su coste y su contenido nutricional, apareciendo la seguridad alimentaria en tercer lugar de sus preocupaciones. Tanto los ciudadanos europeos como los españoles confían en los científicos y en las organizaciones de consumidores como fuentes fidedignas de las que recibir información sobre riesgos alimentarios (34).

El equilibrio entre industria eficiente y medio ambiente es otro de los asuntos candentes en el debate alimentario. Las empresas alimentarias que quieran continuar gozando del favor de los consumidores deberán tener muy en cuenta la sostenibilidad del entorno, buscando el equilibrio entre la eficiencia, las exigencias de la sociedad y la naturaleza.

El 25 de septiembre de 2015 la Organización de las Naciones Unidas aprobó la llamada Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, que regirá los programas de desarrollo mundiales en los próximos años (38). De los diecisiete objetivos incluidos en la Agenda el primero es el fin de la pobreza, siendo el segundo ODS la erradicación del hambre y la consecución de la seguridad alimentaria (*food security*). Para su consecución, la Unión Europea estableció en 2019 el Pacto Verde Europeo (39) como estrategia que engloba múltiples acciones en áreas muy diferentes, algunas de ellas relacionadas con el sistema alimentario europeo, tales como la Estrategia De la granja a la mesa, la transformación inclusiva de la agricultura y las zonas rurales y la reforma de la PAC. De esta forma actualmente se pretende conseguir un Sistema Agroalimentario Sostenible entendido como aquel que “proporciona seguridad alimentaria y nutrición para todo el mundo de forma que no se





comprometan las bases económicas, sociales y ambientales necesarias para generar seguridad alimentaria y nutrición para las generaciones venideras” dentro del concepto de Bioeconomía (40, 41, 42). Esto va en línea con las propuestas de la Comisión EAT-Lancet que están enfocadas en la producción de menor cantidad de alimentos, pero más saludables, con una mejor gestión del suelo, el agua, los nutrientes y la biodiversidad (43).

Esta transición hacia un Sistema Agroalimentario sostenible, ha de ser impulsada por las instituciones y adoptada por las empresas, para dar respuesta a muchos de los interrogantes sobre el futuro a medio plazo.

## 5. CONCLUSIONES

El sector agroalimentario es uno de los sectores empresariales con más influencia e impacto en el mundo, ya que da respuesta a una de las necesidades más básicas de la población: el acceso a la alimentación. Por ello, el sector tiene implicaciones directas sobre el bienestar y la salud de los consumidores, las condiciones de vida y trabajo de millones de personas y sobre el conjunto de los recursos del planeta.

La internacionalización, sin duda, es el aspecto que más ha influido en el desarrollo de la industria alimentaria española en los últimos cincuenta años, tanto de forma directa, por la intensificación en los flujos comerciales y la participación de capital extranjero en las empresas españolas, como de forma indirecta, por el desarrollo y modernización de la distribución alimentaria y la globalización de los patrones de consumo de alimentos.

La globalización económica ha supuesto que las crisis alimentarias hayan dejado de ser locales para convertirse en internacionales. La seguridad y calidad alimentarias han sido preocupaciones instintivas importantes para el ser humano desde la antigüedad, siendo el motivo de la creación de diferentes estándares de calidad y de seguridad que se han ido modificando a lo largo del tiempo.

El Sistema Agroalimentario Mundial actual se enfrenta a diferentes problemas, como la inestabilidad de la producción de alimentos, la pobreza y su consiguiente efecto sobre el acceso desigual a los alimentos, los efectos del cambio climático, la competencia por el uso de la tierra y las posibles interrupciones de las cadenas de suministro mundiales producidas por eventos extraordinarios, tales como la reciente pandemia COVID-19 y el cambio de escenario geopolítico mundial, que nos devuelve a periodos de gran inestabilidad por causas bélicas.

Una vez que la Comisión Europea presente su marco regulatorio para sistemas alimentarios sostenibles y el conjunto de

iniciativas legislativas que lo irán concretando, España tendrá la opción de incorporar toda la normativa al marco jurídico nacional de forma individual o bien negociar una estrategia de política alimentaria con el resto de los grupos de interés que forman nuestro sistema alimentario nacional.

## 6. REFERENCIAS

1. Martín-Cabello, A. Sobre los orígenes del proceso de globalización. *Methaodos. Revista de Ciencias Sociales*, 2013, 1 (1): 7-20. ISSN: 2340-8413. Doi: <http://dx.doi.org/10.17502/m.rcs.v1i1.22>
2. Tugores Ques, J. Los ganadores y perdedores de la globalización. RBA, 2016.
3. Contreras Hernández, J., Gracia Arnáiz, M. Alimentación y cultura. Perspectivas antropológicas. Barcelona, Ariel, 2005.
4. Organización de Naciones Unidas. Declaración Universal de los Derechos Humanos. Nueva York, 1948.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2006. Disponible en: (<https://www.fao.org/3/a0750s/a0750s.pdf>)
6. Fritscher, M. Globalización y alimentos: tendencias y contratendencias. *Política y Cultura*, 2002 (18), 62-82. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26701804>
7. Fanjul, E. 2021. Qué es la globalización. *Iberglobal*. Disponible en: (<https://iberglobal.com/index.php/escuela-de-comercio-exterior/1559-que-es-la-globalizacion>)
8. Clar Moliner, E. La soberanía del industrial. Industrias del complejo pienso-ganadero e implantación del modelo de consumo fordista en España: 1960-1975. *Revista de Historia Industrial*. Año 36. Número XVII. 2008.
9. Langreo, A., Germán, L. Transformaciones en el sistema alimentario y cambios de dieta en España durante el siglo XX. *Historia Agraria*, nº 74. 2018. Disponible en: ([https://www.historiaagraria.com/FILE/articulos/RHA74\\_web\\_Langreo\\_German.pdf](https://www.historiaagraria.com/FILE/articulos/RHA74_web_Langreo_German.pdf))
10. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de la Industria Alimentaria. Subdirección General de Competitividad de la Cadena Alimentaria. 2022. Informe Anual de la Industria alimentaria española. Periodo 2021-2022. Disponible en: ([https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/20220728informeanualindustria2021-20222t22ok\\_tcm30-87450.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/20220728informeanualindustria2021-20222t22ok_tcm30-87450.pdf))
11. Federación de Industrias de Alimentos y Bebidas (FIAB). 2021. Informe económico 2021. Madrid. Disponible en: ([https://fiab.es/es/archivos/documentos/Informe\\_Economico\\_2021.pdf](https://fiab.es/es/archivos/documentos/Informe_Economico_2021.pdf))





12. Red Española del Pacto Mundial de Naciones Unidas. Guía Sectorial en ODS. Sector Agroalimentario. Madrid. 2018.
13. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2021. Informe del consumo de alimentación en España, 2020. Madrid. Disponible en: ([https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020-v2-nov2021-bajas\\_tcm30-562704.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020-v2-nov2021-bajas_tcm30-562704.pdf))
14. Instituto Nacional de Estadística. 2022. Cifras de población — Indicadores demográficos. Disponible en: ([https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736176951&menu=ultiDatos&idp=1254735572981](https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176951&menu=ultiDatos&idp=1254735572981))
15. Instituto Nacional de Estadística. 2022. Gasto total, gastos medios y distribución del gasto de los hogares. Disponible en: (<https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=24900#!tabs-grafico>)
16. MERCASA. 2021. Alimentación en España 2021. Disponible en: ([https://www.mercasa.es/media/publicaciones/291/AEE\\_2021\\_web\\_.pdf](https://www.mercasa.es/media/publicaciones/291/AEE_2021_web_.pdf))
17. Stiglitz, J. El malestar en la globalización. Taurus, 2012.
18. Commission of the European Communities 2000. White paper on food safety. Brussels. Disponible en: (<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6d4b523b-dad8-4449-b2b4-9fa9b0d6e2be>)
19. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2002. Reglamento (CE) No 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. (DO L 31 de 1 febrero 2002). Disponible en: (<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:ES:PDF>)
20. Codex Alimentarius Commission (CAC). Manual de procedimiento del Codex Alimentarius. Vigésimo séptima edición. Roma, FAO. 2019.
21. Apfelbaum, M. Risques et peurs alimentaires. Odil Jacob, Paris, 1998.
22. Chateauraynaud, F. et al. Surveiller et contenir: un monde peuplé de prions. En Les sombres précurseurs. Une sociologie pragmatique de l'alerte et du risque. Editions de L'Ehess, Paris, 1999.
23. Peretti-Watel, P. Sociologie du risque. Armand Colin. Paris, 2000.
24. Beck, U. La Sociedad del riesgo. Hacia una nueva modernidad. Paidós. Barcelona, 1996.
25. Douglas, M., Wildasky, A. Risk and culture. University of California Press. California, 1983.
26. Cámara, M.; Fernández-Ruiz, V.; Domínguez, L.; Cruz, E. Food scientific culture. A food neophobia case study. In A. Muñoz ven den Eynde & C. Polino (Coords.) Pocket Science: The praxeological dimension of scientific culture. CIEMAT, Madrid, 2021.
27. Laspra, B. La alfabetización científica. Catarata, Madrid, 2018.
28. Alonso Andicoberry, C., Fernández Ruiz, V., Cámara Hurtado, M. Cultura alimentaria. El caso del etiquetado de los alimentos. Editorial Catarata, 2019.
29. López-Santacruz, A.M., Cámara Hurtado, M. Seguridad Alimentaria. La comunicación de riesgos y el desarrollo tecnológico. Editorial Catarata, Madrid, 2015.
30. Cámara Hurtado, M; López Cerezo, JA. Cultura científica y percepción del riesgo. En Culturas científicas e innovadoras. Progreso social. Ed. Eudeba, 2015.
31. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2017. The future of food and agriculture: trends and challenges. Rome. Disponible en: (<http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>)
32. Gluckman P. The science-policy interface. Science, 2016, 353, 969. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.aai8837>
33. Waltner-Toews, D. Responding to globalised food-borne disease: risk assessment as post-normal science. EFSA Journal 2019;17(S1):e170718, 8 pp. Disponible en: (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.2903/j.efsa.2019.e170718>)
34. EFSA, 2022. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Food safety in the UE. Special Eurobarometer. Disponible en: (<https://www.efsa.europa.eu/es/corporate/pub/eurobarometer22>)
35. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), 2021. 10ª Encuesta de Percepción Social de la Ciencia y la Tecnología, PSCT — 2020. Disponible en: (<https://icono.fecyt.es/informes-y-publicaciones/percepcion-social-de-la-ciencia-y-la-tecnologia-en-espana>)
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. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60:10, 1738-1746, Doi: 10.1080/10408398.2019.1592107.
37. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2011. Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Disponible en: (<https://www.boe.es/doue/2011/304/L00018-00063.pdf>)
38. Organización de Naciones Unidas. 2015. Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Resolución aprobada por la Asamblea General el 25 de septiembre de 2015. Nueva York. Disponible en: ([https://unctad.org/meetings/es/SessionalDocuments/ares70d1\\_es.pdf](https://unctad.org/meetings/es/SessionalDocuments/ares70d1_es.pdf))
39. European Commission. 2019. The European Green Deal. Brussels. Disponible en: (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52019DC0640&from=ET>)



40. Aguilera, E., Piñero, P., Infante Amate, J., González de Molina, M., Lassaletta, L., Sanz Cobeña, A. Emisiones de gases de efecto invernadero en el sistema agroalimentario y huella de carbono de la alimentación en España. Real Academia de Ingeniería, 2020.
41. Ambikapathi, R., Schneider, K.R., Davis, B. et al. Global food systems transitions have enabled affordable diets but had less favourable outcomes for nutrition, environmental health, inclusion and equity. *Nat Food* 2022, 3, 764–779. Doi: <https://doi.org/10.1038/s43016-022-00588-7>
42. Cámara, M.; Castillo, M.V. La bioeconomía en el sistema agroalimentario: seguridad alimentaria, en "Bioeconomía y desarrollo sostenible", Serie Mediterráneo Económico, n° 31. Alfredo Aguilar, Daniel Ramón y Francisco J. Egea. Ed. Cajamar, 2018.
43. 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-

Si desea citar nuestro artículo:

**El sector agroalimentario español dentro de un mundo globalizado**

M<sup>a</sup> Victoria Castillo Ruiz-Cabello, Elena Cebadera Miranda  
y Montaña Cámara Hurtado

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. n<sup>o</sup>extra (2022) · pp. 555-563

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.21>



## VACUNAS Y ENFERMEDADES OLVIDADAS ¿UN RETO COMPLICADO O UNA ESPERANZA POSTPANDEMIA?

### VACCINES AND NEGLECTED TROPICAL DISEASES: A COMPLICATED CHALLENGE OR A POSTPANDEMIC HOPE?

Juan García-Bernalt Diego<sup>2</sup>, Raúl Manzano-Román<sup>2</sup>, Antonio Muro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Académico correspondiente (electo) de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>CIETUS-IBSAL / Faculty of Pharmacy/ University of Salamanca /Campus Miguel de Unamuno 37007 SALAMANCA, Spain

corresponding author: \*ama@usal.es

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

El progreso de los países en vías de desarrollo está totalmente condicionado por el elevado impacto de un grupo de veinte entidades olvidadas o desatendidas producidas por diversos agentes etiológicos. Aunque para muchas de ellas se dispone de un tratamiento eficaz, tanto las reinfecciones frecuentes como las resistencias asociadas, dificultan enormemente su control. Hasta el momento actual, solamente se dispone de vacunas comerciales para afrontar las infecciones por el virus del Dengue y rabia. Algunas de las razones que justifican su falta de disponibilidad tienen que ver con la baja eficacia de las vacunas clásicas junto con los largos periodos de desarrollo y el escaso interés de la industria farmacéutica. Además, y en cuanto a las enfermedades olvidadas de origen parasitario, su complejidad biológica y estructural junto con su arsenal inmunomodulador, las ha convertido en un difícil reto a nivel profiláctico. La pandemia de SARS-CoV-2 nos ha enseñado el potencial que presentan la tecnología de vacunas de ARNm. La flexibilidad de las plataformas disponibles asociado a la incorporación de nuevas e innovadoras aproximaciones tecnológicas de inmunoinformática, ofrece una nueva esperanza para permitir que en un futuro próximo se solucionen muchos de los problemas sanitarios asociados a la pobreza.

#### ABSTRACT

*The progress of low and middle income countries is absolutely dependent on the high impact of twenty forgotten or neglected entities caused by a wide range of etiological agents. Although there are available treatments against many of them, reinfections and drug resistance hamper their control. Until now, only commercial vaccines are effective to manage for Dengue virus and rabies. Some reasons are the low efficacy of conventional vaccines, the long lasting development and the lack of industrial involvement. Moreover, the biological and structural complexity and immunomodulatory arsenal of the neglected parasitic diseases make this an important prophylactic challenge. SARS-CoV-2 pandemic showed the real potential of mRNA vaccine technology. The flexibility of the platform associated with the new and innovative technological immunoinformatic approaches offer a new hope to face many of the sanitary problems related to poverty population for the near future.*

#### Palabras Clave:

enfermedades tropicales desatendidas  
zoonosis parasitarias  
pobreza  
vacunas  
ARNm

#### Keywords:

neglected tropical diseases  
parasitic zoonoses  
poverty  
vaccines  
mRNA

## 1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia, distribución, control y manejo de las enfermedades infecciosas depende en gran medida de las condiciones socioeconómicas, culturales y ambientales que las acompañan. En comunidades empobrecidas, especialmente en países en vías de desarrollo, una amplia mayoría de sus habitantes viven en ambientes de superpoblación, con falta de agua potable o condiciones inadecuadas de higiene, generando así un caldo de cultivo idóneo para la adquisición y transmisión de enfermedades (1).

A este respecto, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) define el estado de desarrollo de un país en base a su Índice de Desarrollo Humano (HDI, del inglés *Human Development Index*). Este indicador tiene en cuenta numerosos factores para definir la longevidad y calidad de vida de los habitantes de una región, su educación y sus estándares de vida. En una escala de 0 a 1, se clasifica como país en vías de desarrollo todo aquel que no alcanza una puntuación de 0,80. Según el *Human Development Report 2021-2022*, en este año todavía se encuentran por debajo de ese umbral 125 países (2).

A pesar de esta elevada cifra, el HDI global se está incrementando, aunque de manera desigual entre regiones. Una medida de ese progreso es la reducción en morbilidad causada por enfermedades, contabilizada en DALYs (del inglés *Disability Adjusted Life-Years*). El guarismo, en números absolutos, se ha mantenido más o menos constante a lo largo de los últimos treinta años, pero al ajustarlo a la expansión y envejecimiento poblacional, se observa

una clara tendencia descendente. Entre las diez causas principales de ese descenso, cinco son consecuencia directa de un mejor manejo de algunas enfermedades infecciosas: infecciones de las vías respiratorias bajas, sarampión, tétanos, malaria (todas ellas afectan principalmente a niños) y tuberculosis (afecta principalmente a adultos). Asimismo, se incluyen entre las causas principales enfermedades que cursan con diarrea, que también pueden estar provocadas por agentes infecciosos (3). A pesar de esta reducción generalizada, la carga que ejercen las enfermedades infecciosas sigue siendo desproporcionadamente superior en los países con menores recursos, con una fuerte correlación ( $R=0.87$ ,  $p<2,2\times 10^{-16}$ ; vía correlación de Pearson) entre una mayor morbilidad y un menor producto interior bruto per cápita (Figura 1).

En las regiones tropicales y subtropicales del planeta, donde se concentran la amplia mayoría de países en vías de desarrollo, hay cuatro infecciones o grupos de infecciones principales: VIH, malaria, tuberculosis y enfermedades tropicales desatendidas (NTDs) (4). Estas últimas fueron definidas en el año 2005 por los científicos David H. Molyneux, Peter J. Hotez y Alan Fenwick como "condiciones que promueven la pobreza y, a menudo, estigmatizan, teniendo lugar principalmente en áreas rurales de países en vías de desarrollo" (5). Inicialmente incluían 13 entidades, aunque a día de hoy son ya 20, englobando infecciones causadas por parásitos, bacterias, virus y hongos, así como envenenamientos por mordedura de serpiente (6). Las más prevalentes son las parasitosis (Tabla 1) y dentro de ellas las producidas por helmintos que habitualmente cursan de forma crónica con alteraciones que pueden

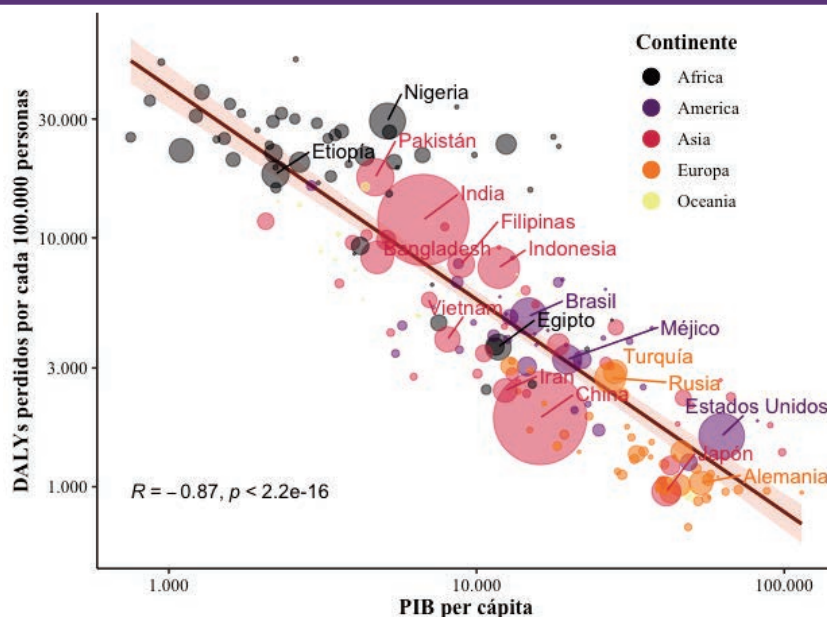


Figura 1. Correlación entre la morbilidad de las enfermedades infecciosas y el producto interior bruto per cápita. Gráfico de burbujas. El tamaño de cada burbuja representa la población de cada país. Representados aparecen 186 de los 194 países mundiales. Solo se muestran los nombres de países con una población superior a 75 millones de habitantes. R y p-valor obtenidos mediante correlación de Pearson entre las variables de DALYs perdidos por cada 100.000 personas y Producto interior bruto per cápita (PIB per cápita). Datos del año 2019, tomados de <https://ourworldindata.org/burden-of-disease>.



estar presentes durante años o décadas (7). Por otro lado, las NTDs de origen vírico, como Dengue o Chikungunya, desencadenan cuadros agudos. En las primeras se han llevado a cabo programas integrados de tratamientos masivos conocidos como MDA (*Mass Drug Administration*), auspiciados por diferentes agencias internacionales y organizaciones no gubernamentales, que han conseguido reducir la prevalencia y la gravedad de estas afecciones. Sirva como ejemplo los programas para la eliminación de la oncocercosis en África (8). No obstante, otras infecciones, sobre todo las producidas por virus, son más difíciles de manejar por no disponer de fármacos adecuados. Esto hace necesario afrontar estas patologías mediante el desarrollo y la aplicación de vacunas efectivas.

## 2. VACUNAS FRENTE A ENFERMEDADES TROPICALES DES-ATENDIDAS

Las NTDs agrupan condiciones que tienen como característica común la capacidad de promover la pobreza y estigmatizar, principalmente en regiones en vías de desarrollo. Bajo esta premisa, algunos autores han denominado vacunas “anti-pobreza” a aquellas dirigidas a su prevención. Sin embargo, a pesar de su importancia capital, esta investigación queda lejos de las prioridades de la industria farmacéutica. Como ejemplo, la inversión combinada en el desarrollo de vacunas contra esquistosomosis, uncinariosis, leishmaniosis y enfermedad de Chagas no superó los 20 millones de dólares en el año 2015 (7), mientras que su prevalencia combinada superaba los 650 millones de personas (Tabla 1).

Más allá de esta falta de interés industrial y la baja inversión público-privada, el desarrollo de vacunas contra NTDs tiene otros retos que superar. El principal es la dificultad de diseñar vacunas que generen protección elevada y duradera contra las NTDs parasitarias, cuyos agentes causales tienen una elevada complejidad genética, estructural y en su ciclo de vida. Hoy en día, la vacuna antimalárica Mosquirix<sup>TM</sup>, comercializada por la farmacéutica GSK, es la única vacuna disponible contra infecciones parasitarias en humanos. Se ha aprobado para su uso en niños menores de 5 años en algunos países africanos (9), aunque no carece de limitaciones tanto en su seguridad, con un preocupante incremento en casos de meningitis en individuos vacunados, como en su capacidad protectora, reducida y poco duradera (10). A este éxito relativo en la lucha contra el paludismo no le ha seguido el de ningún otro parásito.

Actualmente solo encontramos vacunas licenciadas para dos NTDs, ambas de origen vírico, dengue y rabia. La vacuna contra la rabia fue una de las primeras en desarrollarse, por los eminentes científicos Louis Pasteur y Emile Roux en 1885. La vacuna era un virus atenuado que se producía en tejido nervioso de conejo. Este fue el modo de producción habitual durante casi un siglo, aunque desde los años 80s se ha sustituido por producciones más modernas y limpias en cultivos celulares o huevos embrionados. Estas vacunas son de administración intramuscular y pueden ser usadas tanto pre como post-exposición. Con una letalidad en individuos no vacunados superior al 99%, se calcula que la vacuna administrada convenientemente después de la exposición previene el 99% de las potenciales muertes (11). El dengue es la otra NTD que dispone de una vacuna

Tabla 1. Prevalencia, morbilidad y mortalidad de enfermedades olvidadas producidas por parásitos

Parasitosis	Prevalencia (millones)	Morbilidad (DALYs)	Mortalidad (muertes/año)
Ascariosis	800	427.000	14.000
Uncinariosis	450	373.000	1
Trichuriasis	435	373.000	1
Esquistosomosis	190	693.000	24.000
Trematodosis alimentarias	75	1.110.000	7.300
Filariosis linfáticas	29	1.110.000	1
Oncocercosis	15	719.000	1
Chagas	7.2	138.000	8.000
Leishmaniosis	4.8	442.000	14.000
Cisticercosis	2.6	671.000	26.000
Equinococosis	1	47.000	19.000
Tripanosomosis africana	0.007	42.000	3.000



comercial, Dengvaxia, producida por Sanofi y recomendada ya en varios países con dengue endémico. Esta vacuna está compuesta por virus quiméricos entre el virus de la fiebre amarilla y los cuatro serotipos patogénicos de Dengue (12). Aunque la vacuna está siendo utilizada con éxito, las estrategias de vacunación contra el dengue deberían mejorarse. Todavía hay preocupaciones en cuanto a su seguridad, pues incrementa el riesgo de manifestaciones de dengue grave en individuos no infectados. Además, en términos de respuesta inmune, hay una producción desigual de anticuerpos neutralizantes específicos para los cuatro serotipos y es necesario caracterizar mejor la respuesta inmune en diferentes grupos poblacionales (13). Es por ello, que hay diversos candidatos en fases clínicas de desarrollo, algunos de ellos en fase III.

Poniendo el foco en el desarrollo de vacunas contra NTDs causadas por parásitos, el escenario es todavía más desolador que el de las NTDs víricas. Hasta la fecha, solo encontramos candidatos vacunales en ensayos clínicos contra uncinariosis, esquistosomosis y leishmaniosis (14).

### 2.1. Vacunas contra protozoos

Entre las NTDs causadas por protozoos, la leishmaniosis presenta los candidatos vacunales más avanzados. Actualmente, hay cuatro vacunas autorizadas para uso veterinario y diversos candidatos en fases clínicas para su uso en humanos (Tabla 2). Entre ellas encontramos vacunas de primera generación, como la ALM compuesta por *Leishmania* autoclavada que ha llegado a ensayos clínicos de fase II. Vacunas de segunda generación, como Leish-F1, compuesta de proteínas recombinantes de *L. major* y *L. braziliensis*, generando una buena respuesta inmune en voluntarios sanos y siendo eficiente en casos de leishmaniosis cutánea y mucocutánea. Por otra parte, la vacuna Leish-F3, compuesta por el glicocáliz de *L. donovani* y la 24-c-metiltransferasa de *L. infantum*, demostró una respuesta inmunitaria robusta contra la leishmaniosis visceral, altos niveles de producción de citocinas en respuesta a cada componente de la vacuna, considerándose una vacuna segura y bien tolerada en voluntarios humanos. Otras vacunas de desarrollo más moderno, como ChAd63-KH, que utiliza vectores adenovirales expresando los antígenos de *L. donovani* KMP-11 y HASPB han demostrado ser seguras vía intramuscular, induciendo una producción fuerte de INF- $\gamma$  y activación de células dendríticas, encontrándose actualmente en fase II (15).

En el caso de los tripanosomas, nos encontramos dos escenarios muy diferentes. Por un lado, el interés por desarrollar una vacuna contra la tripanosomosis africana es actualmente nulo por parte de la industria. El reducido número de nuevas infecciones anuales y la gran variabilidad antigénica que muestra el parásito en su superficie ha limitado cualquier intento de investigación en

esta entidad. Debido a la falta de vacuna y a la ausencia de quimioprofilaxis, la enfermedad es controlada a través de la detección de nuevos casos y su tratamiento, y, en menor medida, su control vectorial (16). Por otro lado, el interés en desarrollar nuevos candidatos vacunales contra la enfermedad de Chagas es elevado. Los antichagásicos son el único tratamiento eficaz en la fase inicial de la enfermedad. Hoy, el mejor tratamiento profiláctico es el control vectorial, para lo que el desarrollo de una vacuna sería de gran ayuda. Además, una vacuna combinada con la terapia farmacológica representaría un gran avance en el tratamiento de los pacientes crónicos (13). Se ha probado una gran variedad de plataformas de vacunas en modelos animales, incluyendo vacunas de ADN, peptídicas, de proteínas recombinantes, vectores virales y bacterianos y parásitos vivos atenuados. Algunos candidatos han demostrado la capacidad de reducir los daños cardíacos y la necrosis asociada a la infección, principalmente a través de la activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y la producción de INF- $\gamma$  (17).

### 2.2. Vacunas antihelmínticas

Los helmintos infectan a más de un cuarto de la población mundial, causando principalmente una elevada morbilidad. A pesar del uso de tratamientos masivos en niños en edad escolar y otras medidas de control, estos parásitos se están extendiendo a nuevas regiones. Por tanto, el desarrollo de vacunas contra estas infecciones sería una medida óptima para su control, tanto desde el punto de vista de su coste como su efectividad a largo plazo. Además, esta efectividad no se ve amenazada por la aparición de resistencias o las reinfecciones, como lo hace la de los tratamientos masivos. Sin embargo, el desarrollo de vacunas antihelmínticas es inherentemente complejo. Se trata de organismos multicelulares eucarióticos con múltiples fases en su ciclo de vida en las que existe cierta especificidad antigénica. Además, su capacidad inmunomoduladora, así como su refinada evasión de la respuesta inmune aumentan esta complejidad (18). En la actualidad, únicamente existen candidatos vacunales en fases clínicas contra dos de las NTDs causadas por helmintos, la esquistosomosis y la uncinariosis (14).

La esquistosomosis causa elevada morbilidad y mortalidad en muchas regiones. Su control, al igual que el de muchas otras helmintosis, se ha centrado en las últimas décadas en tratamientos masivos con praziquantel. Aunque es el tratamiento de elección, presenta algunos inconvenientes, principalmente no es efectivo contra las formas juveniles de los parásitos y no evita las reinfecciones. Hasta la fecha, más de cien antígenos candidatos se han identificado y probado contra alguna de las tres especies principales causantes de infecciones en humanos (*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*). De estos, solo unos pocos han demostrado cierto nivel de protección y de estos solo un selecto grupo ha llegado a en-

sayos clínicos (19). Actualmente, únicamente cuatro candidatos se encuentran en fases clínicas, uno contra la infección por *S. haematobium* y tres contra *S. mansoni* (Tabla 2).

La proteína recombinante Sh-28GST, derivada de la glutathione S-transferasa de 28 kDa de *S. haematobium* se encuentra actualmente en fase clínica III. En estudios preclínicos, aunque la vacuna no reducía la carga de gusanos, si disminuía de forma significativa la presencia de huevos tanto en tejidos como en heces (20). En su formulación para humanos la proteína recombinante se adsorbe en Alhydrogel como adyuvante y ha mostrado una buena tolerancia y respuesta inmune tipo Th-2 en fases clínicas I y II. Sin embargo, el primer ensayo en fase III en niños infectados generó una protección muy reducida, que podría ser achacada al uso repetido de praziquantel en la población de estudio o el régimen vacunal diseñado para bloquear la producción de IgG4 en lugar de inducir la producción de anticuerpos protectores IgG3 (21).

Tres candidatos se encuentran actualmente en fases clínicas contra la infección por *S. mansoni*, compuestos de diferentes proteínas recombinantes derivadas del parásito. Sm14 es una molécula de unión a ácidos grasos, cuya función es vehicular esteroides y ácidos

grasos provenientes del hospedador (22). En estudios clínicos se ha formulado en una emulsión con el adyuvante glucopiranosil lipido A. En estudios de fase clínica I, la vacuna demostró ser segura y producir potentes respuestas inmunes humorales específicas contra Sm-14, sin causar una producción elevada de anticuerpos IgE. En la actualidad ya se ha concluido un estudio en fase IIa y otro en fase IIb está aprobado, pero aún no se conocen los resultados (19).

La proteína de superficie tetraspanina 2 de *S. mansoni* (Sm-TSP-2), es una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular ha demostrado inducir respuestas protectoras de anticuerpos IgG1 e IgG3 en individuos con inmunidad natural, pero no en infectados crónicos o no infectados (23). Para ensayos clínicos de fase I se ha formulado en Alhydrogel, al igual que Sh-28GST, pero no se dispone todavía de resultados.

Por último, Sm-p80 corresponde a la subunidad mayor de la calpaína, proteasa del tegumento del helminto expresada en varias fases de su ciclo vital. Juega un papel fundamental en la evasión de la respuesta inmune y es, por tanto, crítica para la supervivencia del parásito. Estudios preclínicos en primates con formulación análoga a la Sm14 han mostrado una reducción superior al 93%

**Tabla 2.** Candidatos vacunales contra NTDs de etiología parasitaria en fases clínicas

Parasitosis	Candidato vacunal	Fase de desarrollo	Tecnología	Inmunógeno
Leishmaniosis	ALM	II	Parásito inactivado	Parásito completo
	Leish-F1	I	Proteínas recombinantes	<i>L. braziliensis</i> LeIF, <i>L. major</i> TSA, <i>L. major</i> STII
	Leish-F2	II	Proteína recombinante	Leish-F1 modificada
	Leish-F3	I	Proteína recombinante	<i>L. donovani</i> NH, <i>L. infantum</i> SMT
	ChAd63-KH	II	Vector adenoviral	<i>L. donovani</i> KMP11 y HASPB
Esquistosomosis	Sh28GST/Alhydrogel® (Bilhar-vax)	III	Proteína recombinante	<i>S. haematobium</i> GST
	Sm14/GLA-SE	II	Proteína recombinante	<i>S. mansoni</i> Sm14
	Sm-TSP-2/ Alhydrogel®	II	Proteína recombinante	<i>S. mansoni</i> TSP-2
	Sm-p80/GLA-SE	I	Proteína recombinante	<i>S. mansoni</i> p80
Uncinariosis	Na-ASP-2	I	Proteína recombinante	<i>N. americanus</i> ASP-2
	Na-APR-1	I	Proteína recombinante	<i>N. americanus</i> APR-1
	Na-GST-1	I	Proteína recombinante	<i>N. americanus</i> GST-1



de hembras adultas del parásito y al 89% de huevos en los tejidos. La vacuna ha entrado recientemente en estudios de fase clínica I que siguen teniendo lugar en la actualidad (24).

El otro grupo de helmintosis para el que el desarrollo de vacunas a alcanzado fases clínicas son las geohelmintosis. Se calcula que más de un cuarto de la población mundial está en riesgo de contraer una de estas infecciones y aunque existen fármacos disponibles y eficaces, que son donados de manera gratuita a países endémicos, solo la mitad de los niños en riesgo recibieron tratamiento en 2016 (25). Dentro de las NTDs, hay cinco geohelminthos causantes de infección en humanos: *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis*. Actualmente, los candidatos vacunales más avanzados están dirigidos a la infección por *N. americanus* (Tabla 2).

NaASP-2 es una proteína secretada por larvas infectivas de *N. americanus* a su entrada en el hospedador. Entró en estudios de fase clínica I junto con el adyuvante Alhydrogel en Brasil. Sin embargo, la inyección de una única dosis produjo urticaria en varios participantes. Estas reacciones se asociaron con altos niveles de IgE anti-Na-ASP-2, observados también en poblaciones de zona endémica de infección (26).

Por otro lado, Na-APR-1 (aspartato-proteasa de *N. americanus* expresada en la planta del tabaco) y Na-GST-1 (glutathione-S-transferasa recombinante de *N. americanus* expresada en levaduras) también entraron en estudios de fase clínica I en adultos sanos en Gabón. Utilizando un régimen de tres dosis de vacunación han demostrado alta seguridad. En términos de respuesta inmune, tras la tercera dosis se observó un marcado aumento de células T CD4+ específicas productoras de IL-2 y TNF $\alpha$  que además se han correlacionado con los niveles de IgG específicos. Sin embargo, Na-APR-1 no fue capaz de inducir respuesta inmunitaria de células T (27).

Para el resto de los helmintos causantes de NTDs, la selección y prueba de candidatos vacunales se encuentra en fases preclínicas. Dentro de estas enfermedades, existen diferencias. Algunas, como la dracunculiasis, debido a su bajísima prevalencia, no tiene ni siquiera candidatos vacunales en fases preclínicas. Sin embargo, está a punto de conseguirse la erradicación de la enfermedad (solo 27 casos en 2020). De esta manera, sería la primera enfermedad erradicada sin el uso de una vacuna, ni la existencia de tratamiento (28). El avance en otras entidades viene impulsado por su importancia veterinaria, mucho más que por su impacto en infecciones humanas. Son por ejemplo la equinococosis (29), para la que hay abundantes estudios de vacunación en perros o la fasciolosis para la que se disponen de diversos candidatos en ovejas (30). Finalmente, cabe destacar el papel que podría tener el desarrollo de vacunas contra NTDs en la prevención de cánceres asociados a

infección. Se calcula que en países en vías de desarrollo el 24,5% de los cánceres están causados por infecciones, porcentaje que se eleva al 28,5% si consideramos las zonas más pobres del continente, donde son prevalentes las NTDs (31). Infecciones crónicas con parásitos como *Opisthorchis viverrini* o *Clonorchis sinensis* en el sudeste asiático o *Schistosoma haematobium* en África, han demostrado su potencial carcinogénico (32). En este sentido, las vacunas de ARNm han sido utilizadas frente a ciertos tipos de cáncer, demostrando ser eficaces y seguras y de gran potencial para el futuro tratamiento de los pacientes. A raíz de la pandemia de SARS-CoV-2, las vacunas de ARNm han resultado ser una excelente herramienta para su prevención. A pesar de la complejidad etiológica de muchas de las NTDs, las vacunas de ARNm podrían ser la solución para el control de estas enfermedades.

### 3. VACUNAS DE ARNm

El descubrimiento del ARN mensajero (ARNm) en la década de los 60 del siglo pasado fue reconocido con el premio Nobel. Desde entonces se piensa que puede aprovecharse su potencial para tratar o prevenir muchas enfermedades, sobre todo a partir de los años 70 cuando se demostró que podía ser introducido en las células y, por tanto, ser capaz de expresar antígenos de interés vacunal. Pero fue preciso solventar una importante serie de retos de innovación (como evitar su degradación por nucleasas) hasta poder llegar a testar la primera vacuna basada en el ARNm en la década de los 90, la de la gripe. Posteriormente, se ha tratado de aplicar esta tecnología para prevenir infecciones por importantes patógenos como el virus de la rabia o el del Ébola ya en la década de los 10 del siglo XXI (33). La experiencia acumulada durante décadas, principalmente para el desarrollo de vacunas veterinarias, ha permitido en el inicio de la década de los 20 con la llegada de la pandemia de COVID-19, contar con todo lo necesario, incluido el interés político y empresarial para financiar el reto de descubrir el potencial real y práctico de una vacuna basada en el ARNm. Dicho potencial científico -algo que ya era evidente para la comunidad científica- ha sido validado a nivel poblacional mundial en tiempo récord, gracias a la investigación y a la cooperación entre las entidades gubernamentales, las compañías farmacéuticas y los reguladores legales, que han permitido el desarrollo acelerado de la plataforma de vacunas ARNm para combatir la pandemia.

El ARNm es el enlace entre el ADN en el núcleo y la maquinaria de síntesis de proteínas en el citoplasma. Para evitar la detección por parte del sistema inmunitario innato y permitir así la traducción, el ARNm sintético puede ser optimizado en su secuencia, modificado químicamente y protegido. La naturaleza de la tecnología del ARNm permite una rápida optimización, con combinacio-



nes y posibilidades moleculares casi ilimitadas para la expresión de proteínas complejas que son difíciles o imposibles de generar con los sistemas de expresión actuales. Las vacunas basadas en el ARNm son una modalidad emergente, ofreciendo alternativas a las vacunas vivas y de subunidades con plazos de desarrollo más rápidos y menor riesgo (34,35). Hoy en día ya se asume que el ARNm proporciona una gran plataforma para el desarrollo de vacunas y potencialmente de terapias.

### 3.1. Plataformas de vacunas ARNm: nanopartículas lipídicas

Dado que el ARNm es frágil y se degrada fácilmente, es necesario protegerlo hasta que es captado por las células. En este sentido, las plataformas de vacunas basadas en ARNm utilizan diversos mecanismos y materiales para su transporte protegido. La ingeniería para el desarrollo de estas nanopartículas que pueden encapsular la molécula de ARNm codificante del antígeno vacunal requiere una gran experiencia y cooperación multidisciplinar en disciplinas de bioinformática o la biología estructural funcional (y computacional). Estas plataformas son las que tienen el potencial de desarrollar nuevas vacunas frente a enfermedades olvidadas y que afectan de manera desproporcionada a los países en desarrollo (36). Diversas plataformas basadas en estas moléculas ofrecen ahora nuevas tecnologías y enfoques para lograr vacunas de tercera generación. Fundamentalmente, se utilizan nanomateriales (tamaño < 100-200 nm) lipídicos o nanopartículas lipídicas que son seguros y muy eficaces haciendo llegar el ARNm a las células del sistema inmunitario, fundamentalmente debido a su tamaño nanométrico y a sus propiedades fisicoquímicas (37). Destacan las plataformas de microemulsiones, liposomas, virosomas, nanogeles, micelas y dendrímeros (35). Estas plataformas vehiculan vacunas diseñadas genéticamente y son herramientas prometedoras en medicina humana y veterinaria (38,39), abriendo la nueva era de la "nano-vacunología". Recientemente, han surgido sistemas de entrega capaces de proteger el ARN de las ribonucleasas, al tiempo que lo dirigen a las células inmunitarias y sirven como adyuvantes. Son uno de los temas más relevantes en el campo de la nanotecnología médico-farmacéutica.

En este sentido, las innovadoras formulaciones en nanopartículas lipídicas (LNP) están emergiendo como una solución óptima para proteger el ARNm. Las LNP también facilitan la especificidad del órgano y mejoran la entrega exitosa de la carga de ARNm que codifica las proteínas patógenas al sitio citoplasmático de acción (40). A la hora de diseñar o elegir una plataforma hay que tener en cuenta una serie de factores fundamentales, básicamente las propiedades fisicoquímicas de la NPs. Las LNP son los vectores no virales más investigados para las vacunas de ácidos nu-

cleicos (41) y varias formulaciones basadas en lípidos, como los liposomas, las nano-emulsiones o los portadores lipídicos nanoestructurados se consideran sistemas de entrega adecuados para los ácidos nucleicos.

Los propios liposomas catiónicos actúan como inmunomoduladores estimulando la respuesta inmunitaria innata de forma independiente del antígeno (o patógeno) (42,43). Sin embargo, los lípidos catiónicos no están exentos de toxicidad. Los lípidos ionizables muestran una mejor tolerabilidad en comparación con los lípidos catiónicos, que son más propensos a causar toxicidad celular. Además, las partículas que contienen lípidos catiónicos son propensas a la agregación, lo que provoca efectos indeseables (44). Se han llevado a cabo diferentes modificaciones estructurales en los lípidos ionizables para mejorar su eficacia en la administración de ácidos nucleicos (45,46). Por lo tanto, las formulaciones lipídicas innovadoras están hechas de lípidos catiónicos ionizables combinados con lípidos estructurales estabilizadores y ácido nucleico para producir LNP cargadas con ARNm. También se sabe que la incorporación de lípidos auxiliares PEGlicados en las LNP prolonga el tiempo de circulación, debido a su efecto de barrera estérica. Esta característica reduce la unión de las LNP a las proteínas plasmáticas y disminuye la eliminación por el sistema reticuloendotelial (44,47). El control del tamaño de los PEG-lípidos unidos a las LNP puede utilizarse para dirigir su velocidad de difusión fuera de las nanopartículas y controlar el periodo de tiempo en la circulación sanguínea (48,49). Controlar el tiempo de circulación de las LNP es importante para evitar la toxicidad y aumentar la eficacia.

El almacenamiento a largo plazo es otro reto para las vacunas de ARNm. La mayoría de las vacunas comerciales y los fármacos biológicos son productos liofilizados que se almacenan a temperatura ambiente o refrigerada. La liofilización es una técnica de secado aplicada para la conservación de productos biológicos y nanopartículas farmacéuticas (50). El requisito de almacenamiento en frío de las vacunas COVID-19 basadas en ARNm sigue siendo una limitación importante. Estudios recientes han demostrado que las LNP liofilizadas que contienen ARN conservan sus propiedades biofísicas y su capacidad de expresión proteica in vivo durante 21 meses a 4°C (40,51).

### 3.2. Avances en el desarrollo de vacunas ARNm frente a enfermedades tropicales olvidadas.

El desarrollo, la fabricación y el despliegue de las vacunas de ARNm han entrado ahora en una fase de rápida aceleración. La tecnología del ARNm también podría permitir acelerar el desarrollo y el acceso a las vacunas para algunas enfermedades tropicales desatendidas, con avances significativos frente a muchas de ellas (36). Para muchos candidatos vacunales, como en el caso de la rabia, la





potencia de la vacuna depende de la formación de partículas. De hecho, la rabia es la única NTD que en la actualidad dispone de vacunas de ARNm en desarrollo. Principalmente basadas en una glicoproteína de la cubierta del virus que incluida en vacunas ARNm induce una respuesta inmunitaria neutralizante que protege frente a la infección por el virus en ratones y en primates no humanos. En un ensayo clínico en humanos en fase I se ha visto que administrando dosis bajas de la vacuna se reproducen las respuestas inmunitarias neutralizantes en animales cumpliendo los requerimientos de la OMS para continuar con los ensayos clínicos (52).

Frente a virus transmitidos por artrópodos como es el caso del virus del dengue transmitido por mosquitos, también se están ensayando proteínas de la membrana y proteínas estructurales de la cubierta viral codificadas por ARNm modificados en la secuencia nucleotídica para aumentar su estabilidad y nivel de expresión así como su encapsulación en LNPs. Se están consiguiendo resultados prometedores en ratones de laboratorio gracias a la protección total (respuestas neutralizantes humores y celulares) que induce la vacuna, independientemente de posibles mutaciones en las regiones inmunodominantes serotipo específicas (53,54). Igualmente, frente al virus Chikungunya no existen vacunas ni tratamientos. Sin embargo, hay personas que desarrollan inmunidad humoral natural a través de anticuerpos monoclonales. Hoy en día se está trabajando para tratar la enfermedad con vacunas terapéuticas ARNm que codifiquen esos anticuerpos en LNPs. Los datos preliminares sugieren que puede prevenirse la enfermedad en humanos con efectos adversos aceptables, resaltando el potencial de la plataforma como herramienta terapéutica (55).

La gran mayoría de las vacunas de ARNm que se están desarrollando son para prevenir infecciones por virus, como es el caso de los Flavivirus (56). Para patógenos más complejos, el mayor reto es el diseño de antígenos que cubran mecanismos esenciales para los que se requieren herramientas innovadoras que proporcionen correlaciones de protección a partir de ensayos vacunales en animales de laboratorio (52). Aunque el potencial para desarrollar vacunas ARNm contra parásitos pluricelulares u organismos con ciclos de vida y mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica complejos está por descubrir, se están obteniendo avances significativos en esta dirección. Se están realizando esfuerzos importantes para prevenir la malaria. Recientemente, se ha preparado una vacuna a partir de una nano-emulsión catiónica cargada con ARNm que codifica el factor inhibidor de la migración de macrófagos secretada por los parásitos de la malaria. La nano-vacuna parece mejorar el desarrollo de células T auxiliares e induce anticuerpos IgG contra el paludismo y respuestas de células T de memoria. Además, la proteína del circumesporozoito (CSP) es un antígeno inmunodominante de la superficie de la fase invasiva del parásito de la ma-

laria y ha demostrado un potencial inmunogénico y protector en otra vacuna experimental de ARNm contra la malaria (57,58). Otros avances en la aplicación de nano-vacunas contra parásitos más complejos, como las garrapatas y los patógenos, que transmiten alientan nuevas aplicaciones frente a zoonosis parasitarias (34).

### **3.3. Oportunidades para el desarrollo de vacunas ARNm frente a patógenos complejos: nano-vacunología computacional**

Las vacunas de ARNm también tienen gran potencial para prevenir enfermedades infecciosas y parasitarias complejas para las que no se disponen de vacunas efectivas. Las vacunas basadas en epítopos sintéticos tienen un importante potencial inmuno-profiláctico contra *Fasciola hepatica* en modelos experimentales, pero también han mostrado efectos inmunológicos significativos contra *Leishmania* spp. (59,60). Dado que un epítipo antigénico es una unidad básica que provoca una respuesta inmunitaria celular o humoral, las vacunas multiepitópicas (MEV) compuestas por una serie de péptidos son un enfoque ideal para la prevención y el tratamiento de muchas infecciones, incluidas las enfermedades parasitarias (61–63). Aunque el diseño de MEV eficaces sigue siendo un reto, especialmente el incluir epítopos que puedan inducir células T y B y producir respuestas eficaces, es un objetivo prioritario. En primer lugar, depende de la selección de antígenos candidatos apropiados y de sus epítopos inmunodominantes, que pueden predecirse mediante métodos inmunoinformáticos modernos. Se trata de una estrategia novedosa contra las enfermedades infecciosas que puede proporcionar un nivel de inmunización seguro y una reducción de los costes de producción de la vacuna (64). Posteriormente, una estimulación completa del sistema inmunitario puede lograrse combinando la secuencia de codificación de los péptidos con epítopos universales T helper que ayuda en las respuestas inmunitarias inducidas por péptidos largos. Además, la interesante posibilidad de incluir otros adyuvantes para mejorar así la eficacia de las vacunas peptídicas (65).

Gracias a los avances bioinformáticos, cada vez es más fácil consultar la información genómica y proteómica de todo tipo de organismos patógenos (66). La construcción de conjuntos específicos de péptidos de patógenos podría representar plataformas útiles para desarrollar vacunas seguras y eficaces. Y para ello resultan imprescindibles las herramientas bioinformáticas que permiten predecir la unión de los péptidos al HLA-II, entrando así en el campo de la vacunología computacional para el diseño de vacunas (67).

En el campo de la inmunología esto ha llevado al desarrollo de lo que se conoce como inmunoinformática, un enfoque multidisciplinar que pretende hacer uso de herramientas computacionales, matemáticas y bioinformáticas para comprender mejor el

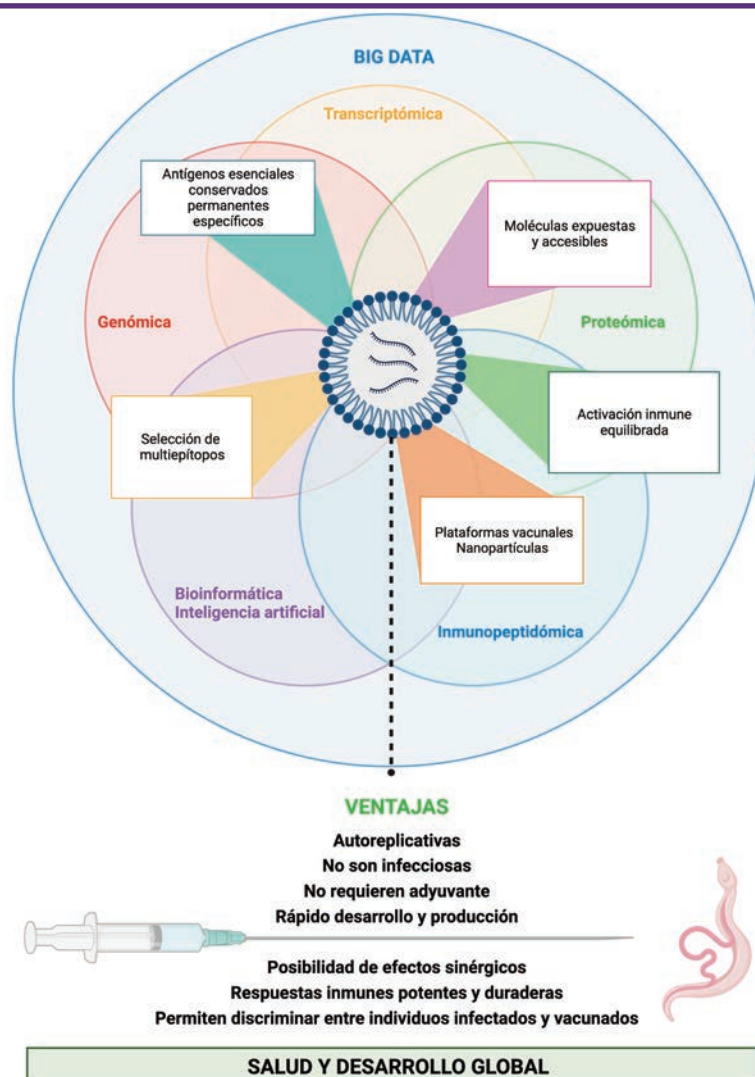


Figura 2. Impacto global de la integración de las vacunas ARNm con la inmunoinformática para el diseño de vacunas inteligentes asequibles. El potencial de las plataformas de vacunas ARNm junto con las ventajas de integrarlas con herramientas predictivas para el desarrollo de vacunas frente a microorganismos complejos puede permitir desarrollar vacunas realmente efectivas y favorecer la implantación de nuevas instalaciones de producción en países con bajos recursos. Creada con Biorender.com

sistema inmunitario en su conjunto y predecir automáticamente soluciones profilácticas para combatir enfermedades, como las vacunas (67,68).

La inteligencia artificial está desempeñando un papel importante en la inmunoinformática al permitir la identificación de secuencias antigénicas de forma automática y optimizada gracias a la enorme cantidad de datos disponibles (69). La vacunología inversa, mediante algoritmos predictivos de "machine learning" permite identificar epítomos o secuencias antigénicas a partir del proteoma de un organismo, sin necesidad de comprobar previamente su antigenicidad de forma experimental (70). El desarrollo de vacunas inteligentes aplicando algoritmos predictivos e inteligencia artificial al conjunto de datos -ómicos es también una realidad hoy en día evitando las ineficiencias y los fracasos del proceso clásico de desarrollo de vacunas reduciendo el tiempo de comercialización de las mismas (Fig 2) (68,71).

En el caso de los parásitos, debido a su gran complejidad biológica, sería muy deseable integrar el mayor número posible de antígenos de forma que se puedan desarrollar vacunas multiestadio y multiespecie. Lo cual puede llegar a ser posible mediante la selección e inclusión de epítomos esenciales, conservados y expuestos en sistemas de nanopartículas lipídicas que induzcan respuestas inmunes equilibradas y duraderas (72). Siguiendo esta estrategia asistida por ordenador, se ha identificado un conjunto de epítomos contra la infección por *Trypanosoma cruzi* (73). También se están tratando de aplicar aproximaciones computacionales similares "in silico" para diseñar proteínas de fusión que puedan ser codificadas por secuencias de ARNm que se auto-amplifiquen una vez administradas en vectores virales para prevenir la leishmaniosis (63). La combinación de la inteligencia artificial con las técnicas de las vacunas basadas en epítomos es un paso adelante para construir moléculas de ARNm con una mayor probabilidad de éxito. Permitiendo

**Vacunas y enfermedades olvidadas ¿un reto complicado o una esperanza postpandemia?**

Juan García-Bernalt Diego, Raúl Manzano-Román, Antonio Muro  
An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 565-577



incluso desarrollar en un futuro vacunas frente a organismos complejos como los helmintos, parásitos que contribuyen de forma mayoritaria a los daños causados por las NTDs (40% del total) y para los que pueden suponer la única opción, a día de hoy, de reproducir y contrarrestar sus propiedades únicas de biomimetismo modulador inmunológico (38,74).

#### 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El desarrollo de vacunas seguras y eficaces para proteger las enfermedades infecciosas y especialmente las enfermedades desatendidas del mundo en desarrollo es de vital importancia en salud pública. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Coalición para la Preparación ante las Epidemias (CEPI, del inglés) han hecho un llamamiento a la acción para desarrollar vacunas contra patógenos que suponen una amenaza crítica para la salud pública. Junto con las enfermedades tropicales desatendidas, las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes también amenazan la salud pública mundial ya que pueden dar lugar a pandemias de forma imprevisible. En este sentido, la velocidad, la escalabilidad y la flexibilidad que ofrece la plataforma de vacunas ARNm son adecuadas para una respuesta rápida a los desafíos venideros. Hasta hace dos años, las vacunas de ARNm nunca habían sido aprobadas. Ahora, los avances científicos ofrecen esperanzas para el control de las enfermedades infecciosas. Se está por tanto abriendo un mundo de posibilidades a medida que los desarrollos de la investigación exploran nuevas aplicaciones e innovaciones con la tecnología del ARNm.

La industria farmacéutica estudia a fondo el mercado de los productos antes de generarlos. Si el mercado no es prometedor en términos financieros, se desestima. Si añadimos las dificultades para desarrollar vacunas contra NTDs, principalmente parasitarias, la probabilidad de poder desarrollar vacunas reales frente a estas entidades es escasa. A modo de ejemplo, el desarrollo de una vacuna contra la esquistosomosis utilizando tecnología de ARNm sería por tanto un reto en el horizonte cercano, integrando los sistemas de salud humana, animal y su entorno compartido, así como su contexto social y económico. Es decir, aplicar estrategias multidisciplinarias denominadas "One Health" que incluyan los organismos de decisión y financiación. El Horizonte 2030 tiene como objetivo estratégico disminuir el impacto negativo de las NTDs en los países en vías de desarrollo, pero también minimizar el riesgo que conllevan los nuevos desafíos de la globalización y el nuevo paradigma de la pobreza.

Las plataformas de nanotecnologías permitirían integrar diferentes dianas moleculares vacunales, basadas en multiepitopos seleccionados con estrategias inteligentes de nano-vacunología, permitiendo el desarrollo de herramientas profilácticas que eviten las

reinfecciones y que tengan gran impacto en la salud mundial, como por ejemplo las vacunas ARNm intravaginales en desarrollo contra el herpes genital o los avances contra la gripe estacional o el virus de Epstein-Barr.

#### 5. REFERENCIAS

1. Tosam MJ, Ambe JR, Chi PC. Global Emerging Pathogens, Poverty and Vulnerability: An Ethical Analysis. In: Socio-cultural Dimensions of Emerging Infectious Diseases in Africa. 2019.
2. UNDP. Human Development Report 2021/2022. 2022.
3. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204–22.
4. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7).
5. Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. "Rapid-Impact Interventions": How a Policy of Integrated Control for Africa's Neglected Tropical Diseases Could Benefit the Poor. *PLoS Med*. 2005;2(11):1064–70.
6. World Health Organization. Neglected tropical diseases [Internet]. [cited 2022 Oct 20]. Available from: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)
7. Hotez PJ, Hotez FJ. The global fight to develop antipoverty vaccines in the anti-vaccine era. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;0(0):1–4.
8. Colebunders R, Basáñez M, Siling K, Post RJ, Rotsaert A, Mmbando B, et al. From river blindness control to elimination : bridge over troubled water. 2018;1–15.
9. Laurens MB, Laurens MB. RTS , S / AS01 vaccine ( Mosquirix TM ): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(3):480–9.
10. Mahmoudi S, Keshavarz H. Efficacy of phase 3 trial of RTS , S / AS01 malaria vaccine : The need for an alternative development plan. 2017;5515.
11. Liu C, Cahill JD. Epidemiology of Rabies and Current US Vaccine Guidelines. 2020;(August):51–3.
12. Pinheiro-michelsen JR, Oliveira S. Anti-dengue Vaccines : From Development to Clinical Trials. 2020;11(June):1–18.
13. Vuitika L, Prates-syed WA, Dinis J, Silva Q, Crema KP, Nelson C, et al. Vaccines against Emerging and Neglected Infectious Diseases : An Overview. *Vaccines*. 2022;10(1385):1–11.
14. Bottazzi ME, Hotez PJ. "Running the Gauntlet" : Formidable challenges in advancing neglected tropical diseases vaccines from de-



- development through licensure , and a “ Call to Action .” 2019;15(10):2235–42.
15. Article R. Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials : A Review of Literature. 2019;
16. Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African Trypanosomiasis. *Lancet*. 2017;390:2397–409.
17. Dumonteil E. The Case for the Development of a Chagas Disease Vaccine : Why ? How ? When ? 2021;
18. Zawawi A, Else KJ, Else KJ. Soil-Transmitted Helminth Vaccines : Are We Getting Closer ? 2020;11(September):1–18.
19. Molehin AJ. Schistosomiasis vaccine development : update on human clinical trials. 2020;1–7.
20. Boulanger D, Warter A, Sellin B, Linder V, Pierce R, Chippaux J, et al. Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. *Vaccine*. 199AD;28(17):319–26.
21. Riveau G, Schacht A, Dompnier J, Deplanque D, Seck M, Waucquier N, et al. Safety and efficacy of the rSh28GST urinary schistosomiasis vaccine : A phase 3 randomized , controlled trial in Senegalese children. 2018;1–22.
22. Tendler M, Simpson AJG. *Acta Tropica* The biotechnology-value chain : Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. 2008;108:263–6.
23. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. 2006;12(7):835–40.
24. Zhang W, Molehin AJ, Rojo JU, Sudduth J, Pramodh K, Kim E, et al. Sm-p80-based schistosomiasis vaccine: double-blind pre-clinical trial in baboons demonstrates comprehensive prophylactic and parasite transmission blocking efficacy. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1425(1):38–51.
25. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 2018;391(10117):252–65.
26. Diemert DJ, Frp C, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Tribolet L, et al. Generalized urticaria induced by the Na -ASP-2 hookworm vaccine : Implications for the development of vaccines against helminths. *J Allergy Clin Immunol*. 130(1):169–176.e6.
27. Id YDM, Betouke ME, Id O, Id FS, Id KAS, Labuda LA, et al. Characterization of T cell responses to co-administered hookworm vaccine candidates Na-GST-1 and Na-APR-1 in healthy adults in Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(10):1–16.
28. Hopkins DR, Weiss AJ, Roy SL, Yerian S, Cama VA. Progress Toward Global Eradication of Dracunculiasis , January 2020 — June 2021. *Centers Dis Control Prev MMWR*. 2021;70(44).
29. Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):1–39.
30. Zhang J, Sun Y, Zheng J. Prospects for liver fluke vaccines. *Exp Parasitol*. 2021;230:108170.
31. Parkin DM, Hämmel L, Ferlay J, Kantelhardt EJ. Cancer in Africa 2018 : The role of infections. *Int J Cancer*. 2020;2103(May 2019):2089–103.
32. Plummer M, Martel C De, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012 : a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal*. 2015;4(9):e609–16.
33. Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*. 2021;597:318–25.
34. Jackson NAC, Kester KE. The promise of mRNA vaccines : a biotech and industrial perspective. *npj Vaccines*. 2020;3–8.
35. John S, Yuzhakov O, Woods A, Deterling J, Hassett K, Shaw CA, et al. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*. 2018;36(12):1689–99.
36. Sparrow E, Hasso-agopsowicz M, Kaslow DC, Singh K, Rao R, Chibi M, et al. Leveraging mRNA Platform Technology to Accelerate Development of Vaccines for Some Emerging and Neglected Tropical Diseases Through Local Vaccine Production. 2022;3(July).
37. Das A, Ali N. Nanovaccine: an emerging strategy. *Expert Rev Vaccines*. 2021;20(10):1273–90.
38. Aida V, Pliasis VC, Neasham PJ, North JF, Mcwhorter KL, Glover SR, et al. Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine : A Herald to Human Medicine Vaccines. *Front Vet Sci*. 2021;8(April):1–20.
39. Feng C, Li Y, Emiliano B, Chen E, Tao W. Emerging vaccine nanotechnology : From defense against infection to sniping cancer. *Acta Pharm Sin B*. 2022;12(5):2206–23.
40. Tsakiri M, Naziris N, Demetrios C. Innovative vaccine platforms against infectious diseases : Under the scope of the COVID-19 pandemic. *Int J Pharm*. 2021;610(August):121212.
41. Aldosari BN, Alfagih IM, Almurshedi AS. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*. 2021;13(206):1–26.
42. Christensen D, Korsholm K, Rosenkrands I, Linderstrøm T, Andersen P, Agger E. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6:785–96.
43. Lonez C, Vandenbranden M, Ruysschaert J. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways ☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(15):1749–58.
44. Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery : Current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;154–155:37–63.
45. Heyes J, Palmer L, Bremner K, MacLachlan I. Cationic lipid saturation





- influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release*. 2005;107:276–87.
46. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*. 2010;28(2).
  47. Hajji KA, Whitehead KA. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat Publ Gr*. 2017;2:1–17.
  48. Webb MS, Saxon D, Wong FMP, Lim HJ, Y LDM. Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly ( ethylene glycol ): effects on the pharmacokinetics of liposomal vincristine. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1372:272–82.
  49. Morrissey D V, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*. 2005;23(8):1002–7.
  50. Luo W, Reilly O, Kim R, Zhang W, Patel SM, Bogner RH, et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021;169(July):256–67.
  51. Uddin MN, Roni MA. Challenges of Storage and Stability of mRNA-Based COVID-19 Vaccines. *Vaccines*. 2021;9(1033):1–9.
  52. Aldrich C, Leroux I, Bidet K, Alexandru M, Loeliger E, Schoenbornkellenberger O, et al. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers : A phase 1 trial. *Vaccine*. 2021;39(8):1310–8.
  53. Pinto AK, Brien JD, Richner JM. A Dengue Virus Serotype 1 mRNA-LNP Vaccine Elicits Protective Immune Responses. *J Virol*. 2021;95(12):e02482-20.
  54. Zhang M, Sun J, Li M, Jin X. Modified mRNA-LNP Vaccines Confer Protection against Experimental DENV-2 Infection in Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;18(September):702–12.
  55. August A, Attarwala HZ, Himansu S, Kalidindi S, Lu S, Pajon R, et al. A phase 1 trial of lipid-encapsulated mRNA encoding a monoclonal antibody with neutralizing activity against Chikungunya virus. *Nat Med*. 2021;27:2224–33.
  56. Wollner CJ, Richner JM. mRNA Vaccines against Flaviviruses. *Vaccines*. 2021;9(148):1–13.
  57. Garcia AB, Siu E, Sun T, Exler V, Brito L, Hekele A, et al. Neutralization of the Plasmodium-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection. *Nat Commun*. 2018;9(2714):1–13.
  58. Mallory KL, Taylor JA, Zou X, Waghela IN, Schneider CG, Sibilo MQ, et al. Messenger RNA expressing PfCSP induces functional , protective immune responses against malaria in mice. *npj Vaccines*. 2021;84:1–12.
  59. Vicente B, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, Del Olmo E, Fernández-Soto P, Muro A. Protection against *Schistosoma mansoni* infection using a *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein from different delivery systems. *Parasites and Vectors*. 2016;9(1):1–13.
  60. Zhang J, He J, Liao X, Xiao Y, Liang C, Zhou Q, et al. Immunobiology Development of dominant epitope-based vaccines encoding Gp63 , Kmp-11 and Amastin against visceral leishmaniasis. *Immunobiology*. 2021;226(3):152085.
  61. Arya A, Arora SK. A T-cell epitope-based multi-epitope vaccine designed using human HLA specific T cell epitopes induces a near-sterile immunity against experimental visceral leishmaniasis in hamsters. *Vaccines*. 2021;9(10).
  62. Sanches RCO, Tiwari S, Ferreira LCG, Oliveira FM, Lopes MD, Passos MJF, et al. Immunoinformatics Design of Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine Against *Schistosoma mansoni* Using Transmembrane Proteins as a Target. *Front Immunol*. 2021;12(March):1–16.
  63. Savar NS, Shengjuler D, Doroudian F, Vallet T, Mac Kain A, Arashkia A, et al. An alphavirus-derived self-amplifying mRNA encoding PpSP15-LmST11 fusion protein for the design of a vaccine against leishmaniasis. *Parasitol Int*. 2022;89(28):102577.
  64. Goumari M, Farhani I, Nezafat N, Mahmoodi S. Multi-Epitope Vaccines (MEVs), as a Novel Strategy Against Infectious Diseases. *Curr Proteomics*. 2020;17(5):354–64.
  65. Ghaffari-Nazari H, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR, Tahaghoghi-Hajghorbani S, Masoumi E, Jalali SA. Improving multi-epitope long peptide vaccine potency by using a strategy that enhances CD4+ T Help in BALB/c mice. *PLoS One*. 2015;10(11):1–12.
  66. Adamczyk-Poplawska M, Markowicz S, Jagusztyn-Krynicka EK. Proteomics for development of vaccine. *J Proteomics*. 2011;74(12):2596–616.
  67. De Groot AS, Moise L, Terry F, Gutierrez AH, Hindocha P, Richard G, et al. Better epitope discovery, precision immune engineering, and accelerated vaccine design using Immunoinformatics tools. *Front Immunol*. 2020;11(April):1–13.
  68. Russo G, Reche P, Pennisi M, Pappalardo F. The combination of artificial intelligence and systems biology for intelligent vaccine design. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(11):1267–81.
  69. Mohanty E, Mohanty A. Role of artificial intelligence in peptide vaccine design against RNA viruses. *Informatics Med Unlocked*. 2021;26(January):100768.
  70. Ong E, Wang H, Wong MU, Seetharaman M, Valdez N, He Y. Vaxign-ML: Supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. *Bioinformatics*. 2020;36(10):3185–91.
  71. Yang Z, Bogdan P, Nazarian S. An in silico deep learning approach to multi-epitope vaccine design: a SARS-CoV-2 case study. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–21.
  72. Joon S, Singla RK, Shen B. Vaccines and Immunoinformatics for



- Vaccine Design. Adv Exp Med Biol. 2022;1368:95–110.
73. Michel-Todó L, Reche PA, Bigey P, Pinazo MJ, Gascón J, Alonso-Padilla J. In silico Design of an Epitope-Based Vaccine Ensemble for Chagas Disease. Front Immunol. 2019;10(November):1–16.
74. Anderson RM. An urgent need: vaccines for neglected tropical diseases. Lancet Infect Dis. 2021;21(12):1621–3.

**Si desea citar nuestro artículo:**  
**Vacunas y enfermedades olvidadas ¿un reto complicado o una esperanza postpandemia?**

Juan García-Bernalt Diego, Raúl Manzano-Román, Antonio Muro  
An Real Acad Farm (Internet].  
An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 565-577  
DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.22>



# IMPORTANCIA DE LA CIRUGIA EXPERIMENTAL PARA LA FORMACIÓN DEL CIRUJANO Y DESARROLLO DE LA CIRUGÍA CLÍNICA

## IMPORTANCE OF EXPERIMENTAL SURGERY FOR TRAINING OF THE SURGEON AND DEVELOPMENT OF CLINICAL SURGERY

**Jose Antonio Rodriguez Montes**

Catedrático de Cirugía, Profesor Emérito de la UA.

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina de España

Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** rodriguezmontes@gmail.com

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

Los avances de la medicina en general y de la cirugía en particular se han debido en gran medida a la experimentación animal, una práctica realizada desde épocas remotas; sin su empleo no hubiera sido posible el progreso científico alcanzado hasta la actualidad. La cirugía científica se basa en la observación, en la investigación clínica y en la investigación experimental. Aunque pueden realizarse ensayos clínicos, respetando las normas éticas, en general la investigación quirúrgica se lleva a cabo en animales. En este texto se comenta el destacado papel que la cirugía experimental desempeña en la formación del cirujano y en el desarrollo de la cirugía clínica.

#### ABSTRACT

*Advances in medicine in general and surgery in particular have been due to a great extent to animal experimentation, a practice carried out since ancient times; without their use, the scientific progress achieved to date would not have been possible. Scientific surgery is based on observation, in clinical research and in experimental research. Although experimentation can be done in humans, respecting ethical standards, usually the surgical research takes place in animals.*

*This text discusses the prominent role that experimental surgery plays in the training of surgeon and in development of clinical surgery.*

#### Palabras Clave:

cirugía experimental  
formación del cirujano  
avances quirúrgicos  
cirugía  
educación quirúrgica  
experimentación animal

#### Keywords:

experimental surgery;  
surgeon training  
surgical progress  
surgery  
surgical education  
animal experimentation



## 1. INTRODUCCIÓN

Los progresos de la medicina en general y de la cirugía en particular, se han debido en gran medida a la experimentación en animales, una práctica realizada desde épocas remotas. Muchos métodos de adivinación de la Antigüedad utilizaban las vísceras de animales en sus ceremoniales. Alcmeón de Crotona, filósofo pitagórico dedicado a la medicina, en 450 a.C. demostró la función del nervio óptico al seccionarlo provocando ceguera en un animal y en los siglos IV y III a.C. Aristóteles (385-322 a.C.), autor de *Historia animalium*, Herófilo de Calcedonia (ca. 300 a.C.), Erasístrato (304-250 a.C.), médicos de Alejandría, figuran entre los pioneros en realizar vivisecciones. Claudio Galeno (130-210), médico romano, basó sus *Disertaciones anatómicas* en las cuantiosas disecciones realizadas en diferentes especies, entre otras en el mono Barbary (*Macaca sylvana*), cerdos y cabras, a pesar de que estaban prohibidas en el Imperio Romano, excepto en Alejandría. En el *Corpus hippocraticum* se describe una experiencia en la que se seccionó la garganta a un cerdo para verificar el proceso de la deglución. En algunas culturas, el uso de animales no fue relevante y más bien tuvo un carácter accesorio o complementario y solo para adquirir conocimientos en muchas ocasiones de forma indirecta; por el contrario, en otras, su utilización fue esencial por sus resultados, en algunos casos relevantes, y sin su empleo no hubiera sido posible el progreso científico o al menos en la magnitud que se alcanzó en determinadas décadas o siglos (1, 2). Por otra parte, con independencia de las aportaciones, en la actualidad es imprescindible y obligatorio desde el punto de vista legal y científico la experimentación animal como paso previo a la investigación con seres humanos en los denominados ensayos clínicos.

El cambio del cirujano técnico al cirujano científico está ligado a la investigación. A la necesidad para el cirujano de dominar la anatomía se ha añadido la exigencia de conocer la fisiología y la fisiopatología y también los conocimientos en las ciencias básicas que sirven de apoyo para una cirugía más racional (2). El fundamento de la cirugía científica nace en la observación, la investigación clínica y la investigación experimental. Aunque puede realizarse (investigación clínica en seres humanos, respetando las normas éticas, la generalidad de la investigación quirúrgica se realiza en animales (3).

En este texto se enfatiza en el destacado papel que la cirugía experimental desempeña en la formación del cirujano y en el desarrollo de la cirugía clínica.

## 2. CIRUGIA EXPERIMENTAL Y EDUCACION QUIRURGICA

Desde la época de John Hunter (1728-1793), considerado el fundador de la cirugía experimental, casi todos los investigadores quirúrgicos han utilizado ampliamente el animal de laboratorio para perfeccionar sus técnicas y poner en práctica sus ideas antes de aplicarlas en clínica humana. Hoy en día es evidente que la fisiología necesita realizar experimentos de variable complejidad en los que el cirujano experimental puede contribuir en gran medida a su ejecución, diseño y puesta a punto.

Una técnica quirúrgica correcta requiere esencialmente práctica, constancia y diligencia, objetivo alcanzable con la praxis de la misma en el animal de laboratorio, ya que los aspectos puramente técnicos tienen mucho en común; siendo por ello, suficiente adaptar lo aprendido en el animal al tratamiento quirúrgico de enfermedades en clínica humana; tanto es así que a veces una técnica utilizada en el hombre sólo puede dominarse por su repetida realización en el laboratorio, como por ejemplo, las anastomosis microquirúrgicas o un trasplante hepático, entre otras muchas. No obstante, de lo anterior no se puede deducir que se deban aplicar siempre y por igual en clínica humana puesto que no es lo mismo lo que se realiza en el animal que operar un paciente, circunstancia que permitiría obtener la impresión de que la cirugía experimental puede ser fácil y sencilla o difícil y muy complicada según la perfección y nivel exigidos. Aquel que realiza una técnica cien veces al año, la hará mejor que aquel que la hace diez. Aunque, como ya dijo Charles Horace Mayo (1835-1939) en 1926 "algunos cirujanos pueden repetir cien veces el mismo error y a eso lo llaman experiencia", generalmente la práctica y experiencia hacen la perfección en la cirugía. En este sentido hay que reconocer la importancia de la cirugía experimental para adiestrar cirujanos en las técnicas operatorias y conseguir, dadas sus semejanzas con la clínica humana, una *adecuatio mente ad rei* entendida la misma como la máxima posibilidad de perfección en el dominio de vivir la realidad. Una base de cirugía experimental es una fuente inapreciable de conocimientos para todo cirujano, cualquiera que sea su formación inicial; estos conocimientos le permitirán valorar con más objetividad y criterio las aportaciones de sus colegas, así como reflexionar con un espíritu más exigente y analítico a los problemas que la clínica le plantea.

El cirujano en el área clínica tiene un ejercicio práctico limitado en determinadas técnicas quirúrgicas. No obstante, en la actualidad, en general, el desarrollo de modelos mecánicos, plásticos y especialmente informáticos con realidad virtual hacen que no sea siempre justificable el empleo de modelos animales solo para entrenamiento del cirujano (4, 5), aunque es cierto que el modelo animal promueve las motivaciones y el uso de animales vivos presenta



para algunos ciertos alicientes que en modo alguno compensan a otros recursos desde el punto de vista técnico. En todo caso, se debe actuar cumpliendo rigurosamente las normas éticas y legales referentes a la experimentación en animales.

La simulación permite reproducir la realidad en un ambiente controlado, para mejorar las competencias profesionales, sobre todo psicomotrices. Esta forma de entrenamiento pretende cubrir las necesidades que desde un punto de vista neurobiológico se exigen para obtener habilidades manuales, como repetición, motivación, visión, compromiso, responsabilidad, participación activa y control del estrés y la fatiga (6). La adquisición de habilidades y destrezas mediante simulación debe seguir los principios pedagógicos del aprendizaje motor de Fitts y Posner: 1.- Etapa cognitiva, en la que se explican las bases de las habilidades a desarrollar; 2.- Etapa integrativa, en la que se repetirán los movimientos y habilidades tantas veces sea necesario, hasta realizarlos correctamente, y 3.- Etapa autónoma, en las que los movimientos y destrezas logran su perfección de modo automático (6). La simulación tiene como objetivos esenciales incrementar la habilidad en los procedimientos quirúrgicos para adquirir mayor seguridad cuando se esté en un caso real, estandarizar técnicas quirúrgicas y repetir la práctica cuantas veces sea necesario.

La capacitación quirúrgica está evolucionando y la simulación se ha mostrado importante como una forma de acelerar la curva de aprendizaje inicial y mejorar las técnicas quirúrgicas. Con tecnología e innovación son posibles cambios importantes en la forma en que adquieren habilidades y competencias los cirujanos. La integración de éstos en el aprendizaje quirúrgico puede impulsar los estándares educativos y mejorar la seguridad del paciente (7).

### 3. AVANCES QUIRÚRGICOS BASADOS EN LA CIRUGÍA EXPERIMENTAL

La experimentación animal y la cirugía experimental han contribuido al conocimiento y progreso de la ciencia quirúrgica al permitir la docencia, la investigación y el ensayo de nuevas ideas y técnicas; faceta esta última, donde radica el especial atractivo que ofrece para los Licenciados en vías de especialización. En este sentido, debemos señalar, una vez más, que gracias al "concepto experimental" se ha avanzado más en los últimos cien años que en todos los siglos precedentes; basta recordar la contribución del cirujano experimental a la solución del problema de la úlcera péptica (experimentos de Whipple, Manny y McRoberts, Morton, Ferguson, McCann, Yvy y Fauley, Matthews, Judd, Billroth, Polya-Balfour, Dragsted, etc) o algunos de los avances quirúrgicos que se basaron en la cirugía experimental, y que por su interés e importancia se reseñan en la tabla I.

En el laboratorio de cirugía se diseñan y aplican en animales diferentes procedimientos quirúrgicos antes de su puesta en práctica en el hombre enfermo; en el laboratorio nacieron las técnicas de cirugía gastrointestinal, vascular, cardiopulmonar y de trasplantes de órganos, entre otros, pero también se investiga en animales la reacción respuesta endocrino-metabólica postraumática, las infecciones quirúrgicas para las que se utilizan los más variados modelos experimentales, que elaborados por el cirujano son aprovechados por otros especialistas. En cirugía es posible beneficiarse de diferentes tipos de modelos, desde modelos teóricos que clarifiquen un objeto, sistema o fenómeno, modelos matemáticos que descifren una función o alteración de la misma, hasta modelos estructurados en seres vivos en quienes se pueden manipular las variables para resolver una cuestión, aceptar o rechazar una hipótesis. Es en el quirófano experimental donde se modifican las técnicas quirúrgicas en uso para tras su ejecución y análisis obtener mejores resultados en la práctica clínica; donde se diseñan nuevas técnicas quirúrgicas para solucionar problemas concretos, se proyectan y mejoran los instrumentos para realizarlas. (8). Es esencial que el modelo experimental se elabore siguiendo un pensamiento lógico que no es más que el método científico, cuyos antecedentes se encuentran en Pitágoras (569-475 a.C.) y Aristóteles (384-322 a.C.) en la antigua Grecia, se manifiesta con Leonardo da Vinci (1452-1519) en el Renacimiento, en la metodología científica de Roger Bacon (1214-1294) en el siglo XIII y culmina con Claude Bernard (1813-1878) en el siglo XIX (9). Es incuestionable que de las observaciones de Hipócrates (460-370 a.C.) y Maimónides (1138-1204), en las que se incluyen conceptos éticos; de las innovaciones de Ambrosio Paré (1510-1590) en la hemostasia y en el tratamiento de las heridas; de Ignaz Semmelweis (1818-1865) respecto a las infecciones puerperales; de Joseph Lister (1827-1912) y William Steward Halsted (1852-1922) en las infecciones quirúrgicas nacieron nuevos conceptos que hicieron progresar a la Cirugía (10). Sin embargo, ellos no utilizaron el métodos experimentales, fue Claudio Bernard (1813-1878) el primero que usó la experimentación como soporte para aclarar sus dudas y para aceptar o rechazar una hipótesis. Son innumerables ejemplos de trabajos en los que aplicando un modelo experimental se obtuvieron resultados que han contribuido al avance de la medicina y de la cirugía en particular (11, 12).

Un elevado número de innovaciones científicas y tecnológicas surgidas en el siglo XX y que han tenido un gran impacto en la salud de la población provienen de la cirugía. Algunas brillantes aportaciones como el *bypass* cardiopulmonar, el trasplante de órganos, la nutrición parenteral total, la cirugía vascular, las prótesis articulares, el tratamiento hormonal del cáncer, la neurocirugía estereotáctica o la cirugía mínimamente invasiva son





sólo algunos ejemplos de cómo la cirugía experimental y la investigación quirúrgica durante el siglo pasado han sido capaces de dar soluciones a grandes problemas de la medicina; testimonio histórico de ello son los nueve premios Nobel otorgados a cirujanos durante este período (13).

Unas reflexiones sobre lo anterior nos permite deducir que la cirugía experimental es necesaria no sólo para los investigadores con dedicación a tiempo completo, sino también para los clínicos y postgraduados, siendo un medio de trabajo y reflexión cuyos principios deberían mantener despierto el espíritu creador cualquiera que sea la especialidad de quien la practica, ya que la cirugía experimental trata no sólo del estudio y desarrollo de técnicas quirúrgicas por sí mismas, sino de la creación de modelos experimentales a partir de los cuales se profundiza en el conocimiento de la patología quirúrgica y facilita las posibles soluciones terapéuticas. Puesto que "investigar es practicar el ejercicio de la creatividad, dedicarse a lo que constituye facultad distintiva de la especie humana", podemos preguntarnos si para ello, ¿existe un lugar más idóneo que un laboratorio experimental? Este contribuye, no solo a la formación general de los postgraduados, que en nuestra opinión deberían rotar por él durante el período de Residencia, sino también a la formación básica durante la fase de especialización en los aspectos relacionados con el aprendizaje práctico.

Además, la práctica de la cirugía experimental estimula la curiosidad y creatividad científicas, desarrolla el espíritu de trabajo en equipo, proporciona educación y criterio quirúrgicos, promueve el interés general hacia los problemas científicos, amplía los conocimientos, crea nuevos métodos de investigación que mejora ésta, plantea nuevas hipótesis de trabajo, forma a nuevos investigadores y a jóvenes cirujanos para que aprendan "a pensar, a analizar y a ser críticos", lo que les ayudará extraordinariamente en el ejercicio clínico de su profesión, inculca el espíritu de libertad académica, el "ethos" de la honestidad intelectual, permite ensayar nuevas ideas y técnicas y el adiestramiento en técnicas quirúrgicas, (técnicas microquirúrgicas, por ejemplo) (14-17).

La experiencia enseña que una estancia, suficientemente vivida, en un Laboratorio de Investigaciones Quirúrgicas no sólo "liberaliza" la mente del individuo preparándolo para aceptar nuevas ideas y desafiar lo desconocido, sino que permite apreciar el gran valor de los experimentos animales para resolver problemas quirúrgicos prácticos: ¿cuál es la prótesis más adecuada en cirugía reconstructiva de la pared abdominal?, ¿qué longitud de intestino puede researse sin desencadenar trastornos nutritivos graves?, ¿Cuál es el material de sutura óptimo para realizar una anastomosis vascular?. Estos son algunos de los múltiples problemas quirúrgicos que pueden resolverse mediante la experimentación animal, siendo

**Tabla I.-** Progresos quirúrgicos basados en la cirugía experimental

Año	Autor	Procedimiento
1925	Soutard	Comisurotomía mitral
1927	Gibbon	Corazón-pulmón artificial
1933	Voronoy	Trasplante renal
1950	Gross, Bailey	Cirugía cardíaca cerrada
1953	Lillehei	Circulación extracorpórea
1954	Murray (*)	Primer trasplante renal con éxito
1960	Harken	Válvula mecánica
1963	Starzl	Trasplante hepático
1964	Detterling	Trasplante de intestino
1966	Kelly, Lillehei, Merkel	Trasplante de riñón y páncreas
1967	Barnard	Trasplante cardíaco
1969	Ionescu	Válvula biológica
1970	Favaloro	Cirugía coronaria
1986	Jarvik	Corazón mecánico
1990	Grant	Trasplante combinado (hígado más intestino)

(\*) El 23 de diciembre de 1954 se realizó en el Hospital Peter Bent Brigham de Boston el primer trasplante renal con éxito total, al trasplantar un riñón entre gemelos univitelinos. El equipo médico estuvo dirigido por el Dr. Joseph Murray (1919 – 2012), quien junto con el Dr. Edward Donald Thomas encontró la utilidad de las radiaciones ionizantes para controlar el posible rechazo en los trasplantes y más tarde ambos también demostraron la utilidad de la azatioprina en este área de la cirugía. Por sus trabajos, ambos investigadores recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1990.



sus resultados, con frecuencia, incorporados a la clínica humana. Es cierto, y así lo hemos constatado, que un año, al menos, dedicado a cirugía experimental sienta las bases indispensables del aprendizaje quirúrgico. El quirófano experimental es útil para “democratizar” las numerosas técnicas quirúrgicas vigentes haciéndolas accesibles a todos, aunque no imprescindible ni justificado con este único objetivo en todos los casos por disponer de otras alternativas ya comentadas (4), lo que permitirá tras su ejecución y crítica valorar mejor sus méritos y posibilidades (18, 19).

Puesto que la cirugía experimental responde a una necesidad de la formación profesional, sería interesante considerar si el carácter obligatorio de la investigación dentro del conjunto de las enseñanzas básicas, tal y como es concebida en varios países, contribuiría a su expansión, conocimiento y revalorización.

#### 4. REFERENCIAS

1. Vaquero C, Diago MV: Esplendor y ocaso de la cirugía experimental. Recuerdo histórico. Rev Esp Invest Quir 2022; XXI:103-107
2. Fisher EJ: Surgical basic science. St. Louis MO. Ed. Mosby Year Book Inc, 1993
3. Alvarez CR: Excelencia en Cirugía. México. Ed. Paré, 1994
4. Vaquero C: Experimentación animal. Diseño y particularidades. Alternativas. En: Bases de la investigación en Cirugía (J. A. Rodríguez Montes, Coord.). Madrid. Editorial Universitaria Ramón Areces 2005:119-124
5. Vaquero C: ¿Es ética la utilización de animales vivos en el adiestramiento de técnicas quirúrgicas? (Editorial). Rev Esp Invest Quir 2014; XVII:151
6. Tapia Jurado J: Retos de la cirugía en el siglo XXI. (Editorial). Cir Ciruj 2017; 85:1-3
7. Nicholas R, Humm G, MacLeod KE, Bathia S, Horgan A, Nally DM et al: Simulation in surgical training: Prospective cohort study of access, attitudes and experiences of surgical trainees in the United Kingdom and Ireland. Int J Surg 2019;67:94-100
8. De la Sierra T: ¿Qué es la cirugía experimental? Cir Gen 1996;18:2
9. Burgos Lázaro R, Burgos Frías N, Gilsanz Rodríguez F, Rodríguez Montes JA: Claude Bernard: médico, fisiólogo, biólogo y creador de la medicina experimental (Parte I). y (Parte II). Rev Esp Invest Quir 2019; 22:109-115 y 116-118
10. Bernal DJ: La ciencia en la historia, 14ª ed. México. Ed. Patria-UNAM, 1994
11. Gutiérrez Samper C: El modelo experimental en Cirugía. Perspectiva histórica. Cirujano General 2000; 22:272-278
12. De la Garza-Rodea AS, Padilla-Sánchez L, De la Garza-Aguilar J, Neri-Vela R: Algunas notas sobre la historia del laboratorio de cirugía experimental. Reflexiones sobre su importancia en la educación e

- investigación quirúrgica. Cir Ciruj 2007; 75:499-505
13. De Oca J: La investigación traslacional en Cirugía (Editorial). Cir. Esp. 2005; 78:135-137
14. García-Sancho Martín L: Objetivos y filosofía de la investigación quirúrgica. En: JA Rodríguez Montes (Dir.), Investigación y Cirugía. Madrid. Editorial Ceura, 1987:13-20
15. Rodríguez Montes JA: ¿Qué aporta la cirugía experimental a la formación del cirujano? (Editorial). Rev Esp Invest Quir 1999; 1:1-3
16. Rodríguez Montes JA: ¿Qué es investigación quirúrgica? Objetivos y filosofía. En: JA Rodríguez Montes (Coord.) Bases de la investigación en Cirugía. Madrid. Editorial Universitaria Ramón Areces 2005:1-29
17. Aggarwal R: Surgical education research: an IDEAL proposition. (Letter to Editor). Ann Surg 2015; 261:55-56
18. Murat J: La recherche expérimentale et la formation chirurgicale aux Etas-Unis. Lyon Chir 1967; 63:402-405

Si desea citar nuestro artículo:

**Importancia de la cirugía experimental para la formación del cirujano y desarrollo de la cirugía clínica**

José Antonio Rodríguez Montes

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 579-583

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.23>



# ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA INSULINA CIENT AÑOS DESPUÉS DE SU DESCUBRIMIENTO

## SOME CONSIDERATION ABOUT INSULIN ONE HUNDRED YEARS AFTER ITS DISCOVERY

Roberto Medina Santillán<sup>1\*</sup>, Ángel García-Quismondo<sup>2</sup> y Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación y Posgrado. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México. México

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC) de Madrid

corresponding author: robertomedsan@yahoo.com; frasan@ucm.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

*Sñar entre las rocas, por colinas y ríos, adentrarse en silencio por regiones boscosas, donde está cuanto escapa al dominio del hombre, idonde huellas mortales tal vez nunca han llegado! Escalar por montañas invisibles, sin rastro, como animal salvaje; y a solas, embebido, contemplar las cascadas, los barrancos más altos; eso no es soledad: es más bien comulgar. Sumergirse en la magia de la naturaleza (Byron, 1906; tomado de El Diario de Edith Holden) (1).*

### RESUMEN

Este artículo quiere ser ante todo un homenaje desde la Real Academia Nacional de Farmacia a todos aquellos, que con su afán descubridor y de aportación al beneficio de la humanidad, permitieron que por allá en las primeras décadas del siglo XX tuviera lugar el descubrimiento de una de las moléculas centrales de nuestro organismo, la insulina. El aporte de esta hormona ha permitido que la vida sea compatible con la carencia de producción endógena de la misma. Nuestro artículo se centra en el esclarecimiento del camino que llevó a los profesionales de la medicina a combatir la Diabetes y a "hurgar" en la herida que produjo la concesión del Nobel a algunos que participaron en el descubrimiento. En él hacemos una pequeña revisión de la importancia de la insulina, en virtud del número de personas que demandan el aporte exógeno diario de esta hormona, así como una breve reflexión sobre la necesidad de la existencia y disponibilidad de diferentes tipos de insulina y la adecuación de su aplicación

### ABSTRACT

*This article wants to be a tribute from the Royal National Academy of Pharmacy to all those who, with their eagerness to discover and contribute to the benefit of humanity, allowed that back in the first decades of the 20th century, the discovery of one of the central molecules of our body, insulin, took place. The contribution of this hormone has allowed life to be compatible with the lack of endogenous production of it. The article focuses on clarifying the path that led medical professionals to combat Diabetes and to "dig" into the wound that produced the Nobel Prize for some who participated in the discovery. In it we make a brief review of the importance of insulin, by virtue of the number of people who demand the daily exogenous supply of this hormone, as well as a brief reflection on the need for the existence and availability of different types of insulin and the suitability of your application.*

#### Palabras Clave:

diabetes  
insulina  
Premio Nobel  
glucosa  
tipos y características de insulinas

#### Keywords:

diabetes  
insulin  
glucose  
Nobel Prize  
insulin types and characteristics



## 1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la Insulina hace ya más de 100 años y su posterior utilización en humanos es probablemente uno de los acontecimientos científicos en el campo de la Medicina de mayor importancia y trascendencia del siglo XX. De hecho, a comienzos del siglo pasado la esperanza de vida de un individuo diagnosticado de diabetes no superaba el año de vida desde el diagnóstico. El curso de la enfermedad era corto e irreversible, finalizando en cetoadicidosis, coma y muerte. Los que sobrevivían cierto tiempo acababan muriendo por las complicaciones asociadas a esta patología; lesiones vasculares, enfermedad renal *terminal*, ceguera, amputación de extremidades inferiores etc. La única forma de evitar la rápida progresión de la enfermedad era a base de restricciones dietéticas, facilitando así la aparición de desnutrición en esa población. A este respecto el Dr. Frederick Allen reportaba en 1919 que tanto la glucosuria como la cetosis podían curarse siempre que se aplicara una dieta de fuerte restricción calórica al inicio de la enfermedad (2). También era típico la supresión total de los hidratos de carbono de la dieta, con elevadísimas cantidades de grasa que incidían muy negativamente sobre la salud cardiovascular de los pacientes.

Releyendo el "Epílogo" del III Curso Avanzado sobre Obesidad publicado en 2016 en un número especial de Anales de la Real Academia de Farmacia (3), podemos afirmar sin temor a equivocarnos, parafraseando a Joseph Conrad tal como lo describe Reverte (4), que en aquellos días de las dos primeras décadas del siglo XX los mapas de la Diabetes mostraban muchos terrenos ignotos alrededor de la insulina, y que para sus descubridores la visita a esos territorios, para ir "nombrando" y poniendo existencia a tales lugares, debía ser particularmente atractiva.

Es difícil conocer de forma precisa que fue lo que orientó a Banting, Best, McLeod, Collip y a otros por allá en los años previos al descubrimiento de la insulina, para que fuera posible la puesta en marcha de un engranaje complejo, que permitiera aislar, purificar, sintetizar, y tener décadas después, al alcance de la mano, una variedad enorme de insulinas para cada tipo y peculiaridad de enfermos con diabetes que precisan del aporte exógeno de esta hormona.

## 2. BREVE NOTA HISTÓRICA SOBRE DEL NOBEL CON EL QUE SE ORTOGÓ EL DESCUBRIMIENTO DE LA INSULINA

Alfred Nobel, posibilitó con su fortuna, la creación de un fondo para poder premiar a aquellas personas que sobresalieran de forma determinante en los campos de la Paz, Literatura, Fisiología o Medicina, Física y Química y muy posteriormente en Economía (5). Nobel, fue ingeniero e inventor, del que se conocen 350

inventos, sobresaliendo por razones evidentes, el de la dinamita, por su enorme importancia en el desarrollo de las vías de comunicación, pero también por su papel negativo y decisivo originado muchas muertes en las guerras pasadas.

Los Premios Nobel, instituidos por el químico e inventor Alfred Nobel en su testamento, y organizados y administrados desde hace más de un siglo por la Fundación Nobel, es uno de los galardones más prestigiosos del mundo y se concede tal como figura en la página oficial "For the greatest benefits to humankind" (traducción libre al castellano "Para mayor beneficio de la humanidad").

Este premio, rodeado de anécdotas, de pequeñas o grandes errores, injusticias o anacronismos, es cada año un soplo de esperanza para muchos. No obstante, es paradójico, como nos dice Flexner (6), que en un mundo saturado de odios irracionales que amenazan a la propia civilización, algunos hombres y mujeres se alejen de esta tormenta venenosa y se entreguen a la extensión del conocimiento, al alivio de los que sufren, a la cura de las enfermedades. Queremos insistir de nuevo que muchos descubrimientos centrales en Medicina, por ejemplo el descubrimiento por Banting de la insulina, el de Minot y Whipple de la bondad del extracto de hígado en el tratamiento de la anemia perniciosa, tuvieron su origen en multitud de conocimientos teóricamente "inútiles" que habían acumulado muchos estudios de científicos "puros" realizados solo por el placer de probar, y que por suerte los escogidos (no sin esfuerzo) pensaron que había llegado el momento de plantear su utilidad (6).

Recordemos que la elección es realizada por el Comité del Nobel de Fisiología o Medicina que está integrado por un conjunto de científicos cualificados y profesores de prestigio, junto con personalidades a las que se ha otorgado el Premio Nobel de esa especialidad, donde el error humano es posible o donde el azar pueda desempeñar. Así, como señalan las bases de los Premios Nobel, los investigadores deben ser premiados en vida y puede ocurrir que, por el infortunio de la muerte, una vez otorgado el premio y nominados los galardonados, el Comité del Nobel tenga que replantearse y "olvidar" a personas que aportaron conocimientos centrales en los avances científicos que llevaron a dicho galardón (7). Así respecto al Premio Nobel de 1923, en el que se premió a los descubridores de la insulina, no deja de ser curioso a) la rapidez con la que se otorgó el premio (solo un año después de su descubrimiento) y b) a quién se concedió por la fundación del Nobel el preciado galardón en 1923 (8).

Es de todos conocido que el premio Nobel en Fisiología o Medicina de 1923 fue otorgado a Frederick G. Banting y John J. R. Macleod por el descubrimiento de la insulina; no obstante, la elección de los dos como laureados ha sido tema de debate desde su concesión. De hecho, fue muy inusual que se concediera el mismo





año el premio Nobel a científicos que habían sido nominados por primera vez. Sin embargo, tal como puede observarse en el material archivado por el instituto Karolinska que concedió el premio, fue verdad para Banting y Macleod. Ellos publicaron su trabajo del descubrimiento de la insulina en 1922 y fueron nominados por primera vez en 1923.

Así según comentan De Leiva y col. (8) (sic) *"El 25 de octubre de 1923, los 19 profesores del Karolinska Institutet decidieron en voto secreto la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina a Frederick Grant Banting y John James Richard Macleod, del Departamento de Fisiología de la Universidad de Toronto, por el descubrimiento de la insulina, publicado en 1922. Banting fue nominado por GW Crile (Cleveland), FG Benedict (Boston), y August Krogh; Macleod fue propuesto por GN Stuart (Cleveland) y también por August Krogh"*.

Esta decisión generó reclamaciones, formuladas por el alemán Georg Ludwig Zuelzer, los norteamericanos Ernest Lyman Scott y John Raymond Murlin, y el rumano Nicolae Constatin Paulescu. Años después, Charles Herbert Best, colaborador de Macleod y Banting, también reclamaría para sí mismo la primacía en el descubrimiento.

Así la Fundación Nobel reconocía que en la documentación que sirvió como base para la concesión del premio no se había tenido en cuenta el primer trabajo publicado por Banting y Best en 1922 (9). En este mismo informe se puntualizaba que Best y Collip habían sido considerados como ayudantes y, por tanto, no eran primeros candidatos al galardón.

En cualquier caso, como apuntaba el historiador Michael Bliss, los cuatro investigadores, Banting, Best, Macleod y Collip, fueron esenciales para el descubrimiento de la insulina (10).

Es muy interesante el material archivado por el instituto Karolinska en relación con el Premio Nobel otorgado a los descubridores de la insulina (9). Recogemos el informe de August Krong, según se cita por De Leiva y col. (8) (sic) *"With the information which I personally have obtained in Toronto, and which also, although less clearly so, emerges from the published works, one may conclude that the credit for the idea behind the work which led to the discovery, undoubtedly goes to Banting, who is a young and apparently very talented man. However, he would definitely not have been able to carry out the investigations, which from the start and during all stages, have been supervised by Professor Macleod"*.

Otros integrantes de la comisión, como Jacobaeus, encontraron más difícil la decisión. Exponemos textualmente las palabras de Jacobaeus según se citan en el artículo de De Leiva y col. (8) (sic): *"Dr. Banting, who undoubtedly was the first to have the idea*

*and who has carried out the investigations, should be the one who in the first place is awarded the prize. On the other hand, it is difficult to evaluate Macleod's contribution. It is not apparent from the literature. Macleod, who is the head of the department in Toronto, has previously carried out investigations on blood sugar. Banting came to Macleod with his idea and purified insulin under the direction of Macleod. I have been told that it is very likely, that the discovery would never have been made if Macleod had not guided him, at least not as early as it turned out. It has even been declared that Banting planned experiments that would not have been successful unless corrected by Macleod. On the basis of what has been said I am most inclined that Banting and Macleod jointly receive the Nobel Prize."*

El flujo de correspondencia no fue escaso por aquellos días respecto a la nominación y el propio August Krong en enero de 1923 mandaba en una misiva dirigida a Göran Liljestrand lo siguiente (sic) *"As you understand from my discourse it is my opinion that the discovery of insulin is of extraordinary both theoretical and practical importance and it will hardly surprise you that I intend to submit a nomination that the Nobel Prize be awarded to Dr. Banting and Professor Macleod."*

Un año más tarde, en febrero de 1924 August Krong dirigía a Göran Liljestrand la siguiente misiva (sic): *"I understand that the prize to Banting and Macleod ignoring other coworkers has not been met with absolute consent on the other side of the Atlantic Ocean and that especially Banting is offended by the fact that Best was not included. However, I am convinced that the correct choice was made."*

Por razones de espacio y contenido de este artículo no comentaremos más "in extenso" la fuerte controversia que surgió en aquellos días, pero hace pensar que el camino del Nobel de 1923 no fue un camino de rosas y que detrás de uno de los descubrimientos más importantes de la medicina, hubo varios científicos enemistados que se enfrentaron.

El propio Banting, en contestación a si investigadores como Paulescu, Zuelzer y otros, como el científico de Rockefeller, Israel Kleiner, merecían algún crédito por el descubrimiento de la insulina, dijo estas palabras (traducción libre del inglés) *"Ninguno de ellos convenció al mundo de lo que tenían... Esto es lo más importante en cualquier descubrimiento. Tienes que convencer al mundo científico. Y nosotros lo hicimos"*.

También, no deja de ser curiosa la reacción del propio Banting al conocer que había sido galardonado con el Nobel (11).

Se cuenta que cuando el teléfono de Frederick Banting sonó una mañana de octubre de 1923, al otro lado de la línea, un

amigo emocionado le preguntó si había visto los periódicos de la mañana. Cuando Banting respondió que no, su amigo le dio la noticia: "Acabas de recibir el premio Nobel por tu descubrimiento de la insulina". Banting le dijo a su amigo que "se fuera al infierno" y colgó el auricular. Luego salió de casa y compró el periódico de la mañana. En los titulares, vio en blanco y negro que sus peores temores se habían hecho realidad. Era cierto que había recibido el Nobel, pero también se lo habían dado a su jefe, John Macleod, profesor de fisiología en la Universidad de Toronto.

### 3. BREVE RESEÑA DEL DESCUBRIMIENTO DE LA INSULINA

El trabajo realizado en la Universidad de Toronto (Canadá) en 1921-22, es para algunos autores (12-15) el evento más "dramático" de la historia del tratamiento de una enfermedad, hoy conocida como Diabetes Mellitus tipo I, hasta aquellos tiempos inevitablemente mortal, siendo pues el impacto de sus resultados increíblemente sensacional. En las siguientes líneas hacemos una somera referencia de los aspectos más importantes que coincidieron en aquel evento.

El Dr. Frederick Grant Banting era un médico canadiense, que estudio en la Universidad de Toronto. Durante la primera guerra mundial fue médico militar. Al finalizar esta, regresa a Canadá en 1919, para completar su formación como cirujano ortopeda, inicia una residencia en cirugía general en un hospital pediátrico en Toronto, posteriormente decide trabajar en medicina privada donde ejerció como médico poco tiempo en Londres Ontario, un pueblo a 200 kilómetros de Ontario. Para ayudarse económicamente acepta trabajar como asistente de profesor en la escuela de medicina de la Universidad del Occidente de Ontario, donde le encargan preparar una clase sobre fisiología y metabolismo de los hidratos de carbono, materia que no le era muy familiar. El domingo 30 de octubre de 1920 estuvo estudiando y preparando su clase hasta altas horas de la noche y leyó un artículo de Moses Barron sobre la rela-

ción de los islotes de Langerhans y la diabetes, en especial con la litiasis pancreática. En la madrugada del lunes 31 despertó súbitamente a las dos de la madrugada pensando en diseñar un protocolo de investigación para aislar la insulina. Consistía en ligar el conducto pancreático de un perro, mantenerlo vivo, esperando la degeneración de los acinis glandulares de la secreción externa pancreática, liberando las células de Langerhans. A la mañana siguiente viajó a Toronto para solicitar una entrevista con el Dr. Miller quien a pesar de no convencerle el proyecto de Banting, le sugirió ir a la Universidad de Toronto a solicitar una entrevista con el Profesor John James Rickard Macleod, reconocido científico escocés, considerado una autoridad en el metabolismo de los carbohidratos en la Escuela de Medicina de la Universidad de Toronto. Banting fue a Toronto para proponerle su proyecto y solicitarle asesoría. Posiblemente el entusiasmo, pasión y confianza del joven médico ayudaron a convencer al profesor quien, le proporcionó un equipado laboratorio y un asistente el Dr. Best.

Desde los tres primeros meses del proyecto contó con la colaboración de Charles Best, estudiante graduado que en ese momento rotaba por el hospital. Fue el profesor Macleod quien sugirió la idea de utilizar a un experto bioquímico para purificar y refinar el extracto de hormona conseguida a la que llamaron "isletina". A tal efecto convenció al Dr. James Collip, joven profesor de bioquímica de la Universidad de Alberta Canadá, para que se uniera a su grupo de trabajo y continuar con las investigaciones.

Banting y Best iniciaron su proyecto de investigación el 17 de mayo de 1921, bajo la supervisión de Macleod. Los experimentos



Figura 2. Charles Best (izq) y Frederick Banting (der) con uno de los perros del laboratorio en la Universidad de Toronto. Agosto de 1921. Thomas Fisher Rare Book Library, University of Toronto. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-59937796#>



Figura 1. Frederick Banting y John Macleod. Fisher Insulin Collection, Rare Book Library, University of Toronto.



J. Leonard Thompson. 15 de diciembre de 1922



J. Leonard Thompson. 23 de abril de 1923

Figura 3. Paciente Leonard Thompson antes y después de recibir tratamiento con insulina (McCormick). Fotos cortesía de Elli Lilly.

iniciaron en mayo de 1921 bajo la supervisión del Dr. Collip, el inicio tuvo sus dificultades, ya que los primeros perros operados murieron por importante pérdida de sangre y severas infecciones. Pronto mejoraron su técnica quirúrgica y continuaron buscando la acción de la hipotética secreción endocrina hipoglucemiante en el páncreas canino. El 3 de agosto de 1921 en un perro pancreatectomizado diabético llamado Marjorie encontraron el befecto hipoglucemiante buscado en uno de sus extractos.

El 11 de enero de 1922, menos de 6 meses después de los experimentos en perros, un niño diabético de 14 años con un peso aproximado de 29,5 kg llamado Leonard Thompson (Figura 3) fue la primera persona en el mundo en recibir la insulina.

Aunque los efectos en el descenso de la glucosa fueron mínimos, afortunadamente no presentó severos efectos colaterales. El 23 de enero recibió un segundo extracto, con algunas modificaciones realizadas por el Dr. Collip buscando una mayor pureza, donde se encontró una rápida respuesta en el descenso de la glucemia. Vivió 13 años con el tratamiento y murió de una neumonía a la edad de 27 años.

La segunda persona en recibir la insulina fue una niña llamada Elizabeth Evans Hughes quien padeció diabetes desde los 11 años y pesaba solo 34 kilogramos. Elizabeth era hija del Gobernador del Estado de Nueva York, Evans Hughes, lo que facilitó, que la madre de Elizabeth contactara con el Dr. Banting, quién aceptó tratarla. Vivió hasta los 74 años. Se menciona que cuando murió había recibido aproximadamente 42.000 inyecciones de insulina.

#### 4. BREVE RECUERDO HISTÓRICO DE LA RELACIÓN DE LA DIABETES Y LA INSULINA

La diabetes mellitus es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo siendo la cuarta o quinta causa de muerte en los países industrializados y con perspectivas de aumentar dramáticamente las cifras de afectados, especialmente en países de medio o bajo perfil económico. En el año 2019 había 463 millones de personas con Diabetes Mellitus y las previsiones apuntan a que se alcancen los 700 millones en el año 2045. Efectivamente, la Diabetes Mellitus está considerada como uno de los retos sanitarios más importantes a combatir en el siglo XXI (IDF, 2019) (16). Desde un punto de vista estrictamente económico la "International Diabetes Federation" (IDF) ha informado de que los costes de la Diabetes Mellitus a nivel mundial se elevaron en 2014, al menos, a 612.000 millones de dólares siendo el gasto sanitario "per cápita" de dos a tres veces mayor en los sujetos con Diabetes que sin ella, lo que equivale, según las mismas fuentes, al 11% del gasto sanitario total. Se incluyen en esta partida los gastos derivados del cuidado de las complicaciones agudas (hipoglucemias y cetoacidosis) y crónicas (enfermedades coronarias, nefropatía, etc.) causadas por la enfermedad.

La evidencia escrita más antigua sobre la descripción de los síntomas de la Diabetes Mellitus la encontramos en el papiro de Ebers que data unos 1550 años antes de Cristo (aC) donde se definen aspectos de la poliuria de Imhotep, sacerdote y ministro del faraón Zoser en el año 3.000 aC. Posteriormente, Arateus de Capadocia





introdujo la palabra diabetes para denominar la "licuefacción de la carne y los huesos en orina". Definiendo la diabetes en el siglo I (17) de la siguiente forma: *"La diabetes es una maravillosa afección no muy frecuente entre los hombres, caracterizada por la fusión de la carne y los miembros en orina. Su curso es de naturaleza fría y húmeda como un edema afectando por regla general a riñones y vejiga; los pacientes orinan continuamente y el flujo es incesante. Como si se abriera un acueducto. La naturaleza de la enfermedad es crónica tardando un largo periodo en formarse, pero una vez establecida la enfermedad, el paciente tiene una corta esperanza de vida ya que la fusión es rápida y la muerte veloz"*.

La diabetes deriva su nombre del griego "fluir", como referencia a uno de sus síntomas más comunes y por el cual el médico inglés del siglo XVII Thomas Willis (1625-1675) le dio el nombre mucho más memorable de "mal de mear" (18).

Distintas interpretaciones del sabor dulce de la orina, más o menos pintorescas, surgen desde el siglo I hasta que en 1859 Claude Bernard descubre que tal sabor se debe a la glucosa sanguínea derivada de una secreción glucogénica del hígado, adjudicando a este órgano un papel central en el desarrollo de la Diabetes Mellitus.

Pero quizás los primeros antecedentes de este gran descubrimiento inician en 1778 con la publicación del Dr. Thomas Cowley en Inglaterra quien describe el caso de un hombre de 33 años que muere seis meses después con el diagnóstico de diabetes, a quien en los hallazgos de la autopsia le encuentran lesiones atróficas en el páncreas, con la presencia de un cálculo que obstruyó el conducto de las secreciones pancreáticas exocrinas que desemboca en el duodeno (12).

Es importante mencionar al estudiante alemán Paul Langerhans, discípulo del Dr. Rudolf Virchow que ya en 1869 describió en su tesis doctoral a un grupo de células pancreáticas diferentes al resto de las que conformaban el tejido pancreático. Más tarde, Gustave Laguese, reconocía que ese grupo de células podría desempeñar otra función distinta a la secreción del jugo pancreático y los denominó islotes de Langerhans (19).

Posteriormente Bouchardat y Lancereaux se convirtieron en los más fervientes defensores del páncreas como órgano fundamental en la etiología de la Diabetes Mellitus. Aquél, ya distinguía, al menos, dos tipos diferentes de Diabetes Mellitus: una grave que se presentaba en jóvenes y que no respondía satisfactoriamente a terapia con dieta y otra en adultos obesos en los que el tratamiento a base de diferentes dietas y ejercicio producía unos resultados excelentes. El comportamiento clínico y los descubrimientos "post mortem" llevaron a asegurar a Bouchardat que la forma más grave tenía un origen pancreático. Lancereaux y su equipo por su parte, llegaron a la misma conclusión sobre la etiología de la enfermedad

e introdujeron dos términos para definir ambos tipos: la diabetes de los delgados y la diabetes de la grasa (20).

En 1889 Joseph Von Mering mientras investigaba sobre la función del páncreas en la digestión y absorción de grasa y basándose fundamentalmente en los trabajos de Claude Bernard, comprendió que para un animal era prácticamente imposible sobrevivir tras una pancreatometomía. Consultó con Óscar Minkowski, científico que trabajaba con Albert Naunyn prestigioso clínico de la época experto en Diabetes Mellitus, con objeto de llevar a cabo experimentos en perros y comprobar la certeza de su teoría. Sin desanimarse por trabajos anteriores, operaron a dos perros y observaron cómo ambos animales sobrevivían sin páncreas y, sorprendentemente, presentaban al día siguiente un cuadro de frecuentes y abundantes micciones. Ante esta nueva situación Minkowski se encargó de estudiar detalladamente la Diabetes Mellitus y sus desviaciones metabólicas y, tras dos años de experimentos, llegó a demostrar que el páncreas era una glándula de secreción interna y que una pequeña parte de ella, cuando se implantaba subcutáneamente a un perro desprovisto de páncreas, prevenía la aparición de hiperglucemia hasta que se eliminaba el implante o bien hasta que degeneraba espontáneamente (21). Posteriores desarrollos permitieron la medida de la glucemia estableciéndose como un dato seguro y fiable para el diagnóstico de la enfermedad.

Entre 1895 y 1921 los experimentos en esta área se centraron en dos aspectos: por un lado, el estudio histológico de los islotes de Langerhans que desembocaron en la identificación de distintos tipos de células capaces de secretar varias hormonas y *enzimas* además de la insulina, y por otro, el estudio de la propia molécula de insulina con intención de utilizarla como recurso terapéutico.

Así, en los inicios del siglo XX, Georg Zuelzer en Alemania y D.A. Scott en los Estados Unidos de Norteamérica intentaron la administración de extractos pancreáticos en humanos pero no lograron resultados reproducibles, posiblemente debidos a lo crudo de sus extractos y a la falta de pureza de la secreción interna por su contaminación con otras proteínas provenientes de las enzimas proteolíticas y la amilasa de los jugos pancreáticos de la secreción externa, con la presencia severos efectos colaterales, además del anhelado efecto hipoglucemiante.

En este sentido los requerimientos para su uso eran muy exigentes. Así, el preparado resultante debía tener la suficiente potencia, tenía que revertir las anomalías metabólicas producidas en un animal desprovisto de páncreas, los signos, síntomas y anomalías químicas de la diabetes humana y, por último, carecer de efectos secundarios.

El inicio de la primera Guerra Mundial que, entre muchos otros inconvenientes, tales como hambruna, inseguridad, angustia



Figura 4. Envases originales de las primeras insulinas comercializadas por Eli Lilly & Company, Indianapolis - USA. Walter Cicchetti / Alamy Stock Photo

de la sociedad e importantes daños al medio ambiente, paralizó la investigación a nivel mundial, dejando en espera el buscado aislamiento y purificación de la misteriosa secreción interna del páncreas, que para esos tiempos ya contaba con el nombre de Insulina propuesto en 1909 por el investigador de Bélgica J. de Meyer y en Inglaterra en 1916 por E.A. Schafer.

Finalmente, y como hemos indicado en la sesión anterior, en el verano del 1921 comenzaron los experimentos que conducirían a la extracción comercial de la insulina en la universidad de Toronto. John J.R. Macleod, profesor de fisiología facilitó su laboratorio para que se realizara un proyecto experimental consistente en ligar el ductus pancreático en perros. Frederick Banting, cirujano, y Charles Best estudiante de cuarto año de fisiología, empezaron a trabajar en ello bajo la supervisión de Macleod.

Tras algunas discusiones sobre el procedimiento a seguir Banting y Best lograron obtener extractos de material pancreático que descendían los niveles de glucosa en sangre en animales de experimentación con y sin diabetes (22). Macleod, sin embargo, pensaba que era necesaria experiencia en el campo de la bioquímica y para ello contó con James Collip, un joven profesor de esta disciplina que estaba pasando un año sabático en el departamento, logró finalmente incorporarse al equipo. Collip empezó a preparar extractos alcohólicos de páncreas fresco mediante técnica de evaporación al vacío; uno de los extractos de vaca fue empleado para tratar al primer paciente que recibía insulina en la historia, Leonard Thompson de 14 años. El muchacho, aunque experimentó un modesto descenso de la glucemia presentó un absceso en el lugar de la inyección, lo que se interpretó como que el preparado todavía presentaba un grado de impureza que desaconsejaba su utilización en tratamientos prolongados así que se procedió a interrumpir el tratamiento recién establecido. Mientras tanto, Collip desarrolló una técnica para separar el principio activo del extracto pancreático de vaca mediante precipitación a una concentración del alcohol diferente a la de otras proteínas contaminantes. El nuevo tratamiento aplicado a Le-

onard Thompson con el extracto así conseguido fue todo un éxito ya que no solo bajaba la glucemia, sino que lo hacía sin efectos secundarios relevantes (23).

En la tabla 1 se resumen muchos hitos relacionados con la insulina y su obtención y comercialización desde 1923 (utilización de técnicas con punto isoeléctrico, definición de la unidad internacional de insulina, insulina protamina, adición de zinc, insulina globina, insulina NPH, insulinas U100, insulinas de un solo pico, introducción clínica de las bombas de insulina, disponibilidad de insulinas recombinantes, descubrimientos de análogos).

En la década de los años 1930-1940, la retinopatía y la nefropatía fueron reconocidas como complicaciones específicas no sólo de los pacientes diabéticos que habían recibido insulina durante muchos años, sino de aquellos con grados más ligeros de hiperglucemia y que no habían seguido tratamiento insulínico. En muchos de esos trabajos, de manera implícita, ya se hablaba de enfermedades macrovasculares concomitantes (26, 27). Más tarde, el Dr. Bell en su monumental estudio sobre arterioesclerosis puso de manifiesto la alta incidencia de enfermedades coronarias en pacientes diabéticos (28).

Allá por 1960 ya se distinguían claramente dos tipos de Diabetes Mellitus una primaria, hereditaria y asociada a un déficit de insulina que representaba la enfermedad clásica conocida y otra secundaria a otras causas (enfermedades pancreáticas, endocrinopatías, etc.). En 1961 Conn y Fajans definieron una historia natural de la Diabetes Mellitus primaria que constaba de las siguientes fases: prediabetes, diabetes subclínica, diabetes latente y diabetes clínica o manifiesta (29). Cuando el recorrido por estas fases era rápido los autores aseguraban que la Diabetes Mellitus aparecería de forma aguda y sería de comienzo juvenil, mientras que si el agotamiento de la célula  $\beta$  era más lento pasaría por todas las fases y la presentación de la enfermedad se daría en el adulto. Toda esta historia natural representaría el progresivo agotamiento de la célula  $\beta$  dañada por el trastorno genético previo y sería un proceso diná-





mico con progresiones y eventuales regresiones, en donde las complicaciones asociadas a la Diabetes Mellitus podrían presentarse en cualquier fase. El cuadro clínico completo se reflejaría en dos tipos de pacientes: Diabetes Mellitus infanto-juvenil y Diabetes Mellitus de la madurez, siendo la edad la única diferencia entre ambas y, por tanto, serían diferentes grados y peculiaridades de un mismo trastorno. Todos estos conceptos estuvieron vigentes durante muchos años, pero la aplicación de métodos más precisos sobre la base genética de la enfermedad y la mejor interpretación de los factores ambientales y sociales, demostraron que la aparente uniformidad de este esquema no se correspondía con la realidad.

La introducción de las técnicas de radioinmunoanálisis permitió comprobar que muchos pacientes diabéticos presentaban niveles de insulina en sangre tanto normales como, en algunos casos, elevados. Estas observaciones pusieron de manifiesto que la Diabetes Mellitus no era debida solamente a la ausencia de insulina, como se pensó durante mucho tiempo, sino que podría ser también el resultado de un problema en la acción de la insulina o, simplemente, un defecto de la propia molécula. Este hallazgo contribuyó a proporcionar una heterogeneidad patogénica muy considerable a la Diabetes Mellitus. A la luz de estos y otros descubrimientos la clasificación y el diagnóstico fueron evolucionando con el tiempo hasta llegar al año 1979, cuando un comité de expertos revisó la clasificación y los criterios diagnósticos y publicó un informe. Posteriormente en 1997 y 1999, tal informe fue actualizado, para introducir cambios en el diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional (30).

Históricamente la insulina se extrajo de material pancreático obtenido de diferentes especies animales entre ellas las ovejas, vacas, cerdos, ballenas etc., aunque con la que se inició la terapia en pacientes con diabetes mellitus eran de cerdo y vaca, probablemente por la similitud de la secuencia de aminoácidos con la insulina humana y por la gran disponibilidad de estos animales en los mataderos. No obstante, a pesar de la semejanza, y por razones inmunológicas se empezó a aislar insulina humana (31) de páncreas humanos en los años 1960, pero las cantidades así conseguidas eran muy limitadas, sin olvidar los problemas éticos que se plantearon. Por ello, y a raíz del conocimiento cada vez más detallado del ADN y de la posibilidad de su manipulación y a través de procesos de fermentación en ciertos microorganismos se logró obtener una insulina con idéntica secuencia de aminoácidos que la humana (insulina recombinante) en cantidades lo suficientemente grandes para abastecer la demanda de los canales de suministro del todo el mundo (32). En septiembre de 1978, un equipo de científicos del Hospital City of Hope en el sur de California y la empresa de biotecnología Genentech en San Francisco anunciaron que ya los pacientes con diabetes tipo I no tenían que tratarse inyectándose insulina recu-

perada de los tejidos de vacas o cerdos como subproducto de la industria cárnica, sino que podían, por primera vez, inyectarse insulina humana. En la mañana del 14 de octubre de 1980, los corredores de bolsa se sumergieron en un frenesí para comprar las acciones de la recién lanzada Genentech, que hizo multimillonarios a sus fundadores, el capitalista de riesgo Bob Swanson y el científico Herb Boyer (32).

La compañía Eli Lilly utilizó *Escherichia coli* como elemento huésped mientras que Novo Nordisk optó por el *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de insulina humana (Tabla 1).

Así, como quiera que la insulina tiende a formar hexámeros durante su almacenamiento, la disociación en monómeros activos en el lugar de la inyección se vuelve lenta de forma que la tasa de absorción es pequeña y, por tanto, la entrada a la circulación sanguínea resulta menor de lo esperado. Los análogos de insulina rápida se crearon con la intención de solucionar el problema. Pequeñas modificaciones en la estructura de la molécula mantendrían la insulina en forma de monómeros aumentando la velocidad de absorción y de difusión, eso sí reteniendo la afinidad por su receptor. Así al análogo "Lyspro", comercializado por Lilly en su momento, consiste en sustituir la Prolina y la Lisina de las posiciones B28 y B29 por Lisina y Prolina respectivamente consiguiendo así el efecto deseado. Novo Nordisk, por su parte, decidió cambiar la posición B28 por ácido aspártico. La presencia de un ácido en el grupo carboxilo terminal impide la formación de hexámeros por su carga negativa. Ambas moléculas logran una mayor rapidez de acción controlando mejor las excursiones de glucosa tras la ingesta.

Otro aspecto que debe resaltarse es la importancia de reducir la glucemia en ayuno, lo que dio lugar a la aparición de los análogos de acción retardada. El primer análogo de insulina retardada aprobada para su uso clínico fue la glargina de la compañía Aventis. "Glargina" contiene dos modificaciones estructurales de la molécula de la insulina humana; primero se añaden dos Argininas en la región carboxilo terminal de la cadena B (B31 arg y B32 arg, posiciones no presentes en la insulina humana) de esta forma se cambia el punto isoeléctrico de la proteína desde pH 5,4 a pH 6,7, lo que provoca un cambio en la solubilidad, así se vuelve más soluble a pH ácido, pero menos a pH neutro. Como el análogo se conserva en pH ácido es necesario otra modificación para evitar la desaminación de la Asparagina en posición 21. Se logra sustituyendo la Asparagina por glicina en la posición A21. Al ser menos soluble a pH fisiológico subcutáneo, una vez inyectado el análogo se formará un microprecipitado que se va absorbiendo lentamente. En teoría, tras su inyección se consigue un perfil plano sin picos que ayuda a mantener la glucemia basal estabilizada durante su tiempo de acción, de 20 a 24 horas. "Detemir" es un análogo de insulina de acción prolongada obtenido mediante la adición de ácido mirís-

**Tabla 1.** Hitos más importantes en el descubrimiento, obtención y comercialización de la insulina y sus análogos

1921. Extractos pancreáticos demostraron una bajada de los niveles de azúcar en sangre en experimentos con perros diabéticos (Banting, Best y Madeod. Toronto)
1922. Primer uso de insulina en humanos (Leonard Thompson. Toronto)
1923. El punto isoeléctrico produjo grandes cantidades de insulina de alta potencia extraída de fuentes animales, suficientes para satisfacer la cadena de suministro comercial
1925. Primera unidad internacional de insulina definida como (1 unidad = 0,125 mg de material estándar). Las insulinas U40 y U80 estuvieron disponibles
1926. Insulina cristalina estable (Abel)
1936. Adición de Zinc a la insulina protamina (IPZ) para crear una insulina de acción prolongada (Scott, Fisher, Hagedorn)
1939. Insulina Globina con menor duración que la IPZ desarrollada
1946. NPH (neutral protamine Hagedorn). Insulina desarrollada con cantidades controladas de protamina (Nordisk company)
1951. Insulinas lente, desarrolladas para retardar la acción sin necesidad de modificación proteica (Novo company)
1955. Determinación de la estructura primaria de la insulina (Sangel y colaboradores)
1960. Utilización del radioinmunoensayo para identificar la insulina (Berson, Yalow)
1967. Descubrimiento de la proinsulina (Steiner)
1967. Primer trasplante de páncreas (Kelly, Lillehei y colaboradores)
1971. Establecimiento del receptor de la insulina (Roth, Cuatrecasas y colaboradores)
1972. Introducción en el mercado de las insulinas U100 para una mayor precisión en la administración
1973. Utilización de pequeñas dosis de insulina intravenosa para tratamiento de la acidosis como alternativa al tratamiento con altas dosis subcutáneas (Alberti y colaboradores)
1976. Disponibilidad del péptido c para uso clínico (Rubenstein y colaboradores)
1977. Clonación del gen de la insulina (Ullrich, Rutter, Goodman y otros)
1978. Descubrimiento de las insulinas de "un solo pico" purificadas (Lilly company)
1978. Introducción clínica de las bombas de insulina
1981. Descripción de la actividad del receptor de insulina, insulina quinasa (Kahn y colaboradores)
1982. Disponibilidad de la insulina recombinante humana (Lilly company)
1989. Primer trasplante de islotes (Lacy y colaboradores)
1990. Se incrementa la aceptación de los sistemas de inyección de insulinas
1996. Lanzamiento del primer análogo de insulina de acción rápida: "insulina lispro (Humalog)"
2000. El "Edmond Protocol" mejora los resultados de los trasplantes de islotes
2001. Lanzamiento del análogo de insulina de acción retardada: "insulina glargina (Aventis company)"
2013. Descubrimiento de los análogos de acción prolongada "Degludec (Novo Nordisk company)"
2013. Esclarecimiento de la estructura cristalina del receptor de insulina
2017. Lanzamiento de análogos de insulina de acción ultra rápida "Fiasp (Novo Nordisk company)"



tico (un ácido graso de 14 carbonos) en posición B29 así como la eliminación de la Treonina en la B30. Esta modificación, permite establecer una unión reversible con la albúmina sérica, incrementando la vida media del análogo. También presenta una duración de acción cercana a las 24 horas lo que le otorga un perfil adecuado para ser utilizado de forma basal.

Recientemente se han comercializado nuevos análogos que dependiendo de su mecanismo de acción se pueden dividir en "ultra-rápidos" y "de acción prolongada". En realidad, desde que se descubrió la insulina todos los esfuerzos para encontrar una terapia eficaz se han encaminado a reproducir el modo de actuación de la insulina en el organismo. La insulina se almacena en gránulos secretores de las células  $\beta$  pancreáticas y no son liberadas al torrente sanguíneo hasta que se produzca una señal específica que estimule la exocitosis (33). La presencia de glucosa en sangre, pero particularmente el cambio de concentración de la glucemia actúa como el estímulo principal para la liberación de insulina, siguiendo un patrón determinado, ya que si nivel de glucosa se eleva lentamente la secreción de insulina será igualmente lenta. Si por el contrario existe una subida abrupta de la glucosa, la secreción de insulina sigue un patrón bifásico; a un "pico" inicial como respuesta le sigue

una secreción más lenta. Esta rápida respuesta es esencial para el mantenimiento de una homeostasis óptima de la glucosa. La pérdida de esta característica se ha considerado como un signo precoz de disfunción de la célula  $\beta$  (34). Con los nuevos análogos Insulina "Aspart", "Glulisina de acción ultra-rápida" (comienzo de acción a los 15 minutos) o la "insulina Degludec" con acción prolongada (libera insulina hasta 42 horas tras la administración) se pretende satisfacer las necesidades terapéuticas para un mejor control de la glucosa en sangre. En el caso de "Degludec" la molécula ha sido obtenida por omisión de la Treonina en la posición B30 sustituyéndola por una cadena compuesta por ácido glutámico y un ácido graso de 16 carbonos. "Aspart" es un análogo obtenido sustituyendo la prolina de la posición B38 por una molécula de ácido aspártico y la "Glulisina" se obtiene reemplazando la asparagina de la posición B3 por lisina y la lisina de la posición B29 por ácido glutámico.

En las Tablas 2 a 4 se presentan un resumen de los diferentes tipos de insulina y sus aplicaciones terapéuticas dependiendo de su mecanismo de acción, de su estructura química y de su acción farmacocinética.

Dadas las características de este artículo no insistiremos más en los diferentes tipos de insulinas actualmente existentes, pero

**Tabla 2.** Tipos de insulina atendiendo a su mecanismo de acción.

<b>Acción ultra-rápida</b>	Fiasp, Humalog Kwikpen, Apidra
<b>Acción rápida</b>	Actrapid, Humulina regular, Novorapid, Humalog
<b>Acción intermedia</b>	Insulatard, Mixtard 30, Mixtard 50, Novomix 30, Novomix 50, Novomix 70, Humalog mix 25, Humalog mix 50, Humalog 30/70, Humulina 30/70, Humulina NPH Kwikpen, Humulina NPH
<b>Acción prolongada</b>	Levemir, Tresiba, Lantus, Abasaglar, Toujeo

**Tabla 3.** Tipos de insulina atendiendo a su estructura química

Insulina	Inicio de acción	Pico de acción	Duración de acción	Glucosa objetivo
<b>Acción ultra-rápida</b>	10-15 minutos	40 minutos	4-6 horas	Postprandial
<b>Acción rápida</b>	10-20 minutos	1-3 horas	3-5 horas	Postprandial
<b>Acción intermedia (NPH)</b>	2,5-3 horas	5-7 horas	13-16 horas	Glucosa en ayunas si el pinchazo es antes de acostarse o media tarde si el pinchazo es al levantarse
<b>Acción prolongada (Detemir, Glargina)</b>	3-4 horas (Detemir) 1,1 horas (Glargina)	5 horas (Glargina)	24 horas (Detemir) 18-24 horas (Glargina)	Glucosa basal
<b>Acción muy prolongada (Degludec)</b>	Liberación lenta y constante durante 24 horas	Distribución por igual en las primeras y segundas 12 horas	El estado estacionario se alcanza a los 2-3 días del inicio del tratamiento	Glucosa basal

**Tabla 4.** Tipos de insulina atendiendo a sus características farmacocinéticas tras inyección subcutánea

Insulina	Inicio de acción	Pico de acción	Duración de acción	Glucosa objetivo
<b>Acción ultra-rápida</b>	10-15 minutos	40 minutos	4-6 horas	Postprandial
<b>Acción rápida</b>	10-20 minutos	1-3 horas	3-5 horas	Postprandial
<b>Acción intermedia</b>	2,5-3 horas	5-7 horas	13-16 horas	Glucosa en ayunas si la administración es antes de acostarse o media tarde si el pinchazo es al levantarse
<b>(NPH)</b>				
<b>Acción prolongada (Detemir, Glargina)</b>	3-4 horas (Detemir) 1,1 horas (Glargina)	5 horas (Glargina)	24 horas (Detemir) 18-24 horas (Glargina)	Glucosa basal
<b>Acción muy prolongada (Degludec)</b>	Liberación lenta y constante durante 24 horas	Distribución por igual en las primeras y segundas 12 horas	El estado estacionario se alcanza a los 2-3 días del inicio del tratamiento	Glucosa basal

se recomienda la visita a la Web de la Real Academia Nacional de Farmacia y en particular al VI Curso Avanzado sobre Obesidad y Síndrome Metabólico, en particular a la ponencia del Dr. Mario García Gil (35) titulada “El mundo de las insulinas en la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico”. Según este mismo autor, las variaciones de los niveles de glucosa en sangre van a generar o condicionar variaciones en la producción y secreción de insulina. Por ello, existirá una secreción basal de insulina y una secreción prandial, por lo que en situaciones de diabetes tipo 2 se deberán medir tanto los niveles de glucosa basal en ayunas como los prandiales para establecer la pauta posológica de insulina (35).

Muy interesante y de utilidad práctica para el manejo de la diabetes tipo 2 es la utilización de algoritmos terapéuticos acuñados por sociedades científicas nacionales e internacionales que establecen los escalones terapéuticos según los niveles de hemoglobina glicosilada y condicionantes clínicos, siendo las insulinas un escalón tardío a utilizar o en situaciones clínicas concretas. Hoy día, existe una amplia gama de insulinas en el mercado siendo las recombinantes, fabricadas mediante biotecnología, las más usadas tanto en su uso en forma de bolos por picos prandiales, como las de acción prolongada para controles de niveles basales (35). En este último caso, se han desarrollado insulinas que, mediante formulación galénica han ralentizado su absorción, con el objeto de evitar

las pautas posológicas cada 12 horas, permitiendo su administración cada 24 horas, con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente y su cumplimiento terapéutico, tal como hemos resumido en las tablas 2 a 4.

Un avance excepcional ha sido las llamadas **bombas de insulina**, consideradas un esbozo del páncreas artificial, utilizadas por primera vez en humanos en 1978 (Tabla 1). La bomba de insulina ha ido modificando su tamaño y sus características desde su primer diseño, siendo hoy día un pequeño dispositivo (del tamaño de un teléfono móvil) que administra insulina de forma continuada (36). Consta fundamentalmente de dos partes: el infusor de insulina y el catéter de conexión. El infusor es una microcomputadora integrada por una pantalla, una batería, unos botones y un reservorio de insulina, que ha sido programada previamente para infundir insulina de manera continua las 24 horas del día. Mediante un sensor de glucosa, una bomba de insulina y una fórmula matemática se encarga por sí solo de mantener a raya las cifras de glucosa en sangre, idealmente en cualquier situación (estado postprandial, ejercicio, estado interprandial). El catéter de conexión es un fino tubo de plástico que conecta la bomba con el tejido subcutáneo. Este catéter termina en una cánula de plástico que está localizada debajo de la piel. Allí será donde se deposite la insulina administrada por la bomba. La cantidad de insulina que se va a infundir está progra-

mada previamente por el equipo diabetológico, el paciente y/o su familia basándose en los controles de glucemia, pudiendo modificarse la tasa basal de insulina a inyectar hasta cada 30 minutos. Utiliza análogos de insulina de acción rápida.

En la actualidad ya se manejan bombas o sistemas híbridos que conlleva el empleo conjunto de dos aproximaciones tecnológicas de diferente base, pero complementarias entre sí: 1) mantener un nivel de glucemia determinado sin que intervenga el paciente; 2) contar con la participación del paciente en dos situaciones muy concretas: las comidas y la actividad física. En el caso de las comidas, el paciente tiene que introducir la cantidad estimada de carbohidratos que va a ingerir en las comidas y darle la orden táctil al dispositivo para que administre la insulina calculada en forma de bolus. En el caso del ejercicio físico, de manera anticipada el paciente antes de iniciar la actividad debe indicar al sistema tipo de actividad y duración y programar un objetivo de glucemia algo elevada para evitar la hipoglucemia. Los nuevos sistemas son capaces de administrar automáticamente bolus de insulina para corregir en todo momento una cifra de glucosa fuera de objetivos. No obstante, a pesar del enorme avance, el equipo en cierto modo es aún "rudimentario", ya que supone la intervención frecuente del paciente, y problemas relacionados con la función del sensor, las calibraciones y la repetición de molestas alarmas (36).

## 5. BREVE MENCIÓN DE LA ESTRUCTURA, SÍNTESIS, SECRECIÓN Y PAPEL DE LA INSULINA.

La **insulina** (del latín *insula*, "isla") es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células beta de los islotes pancreáticos. Aunque la insulina fue reconocida rápidamente como una proteína tras su descubrimiento, la confirmación de su estructura primaria no ocurrió hasta el año 1955 cuando Sanger desarrolló una metodología nueva para de-

terminar la secuencia primaria de las proteínas, la primera de las cuales fue, precisamente, la insulina (36). Esta consta de dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuros.

Ambas cadenas, A y B, están formadas por 21 y 30 aminoácidos respectivamente y están unidas por enlaces covalentes entre las posiciones CysA7 y CysB7 y entre las posiciones CysA20 y CysB19. Existe, además, un enlace intracatenario adicional en la cadena A que conecta las posiciones Cys6 y Cys11. Esta estructura se ha mantenido a lo largo de la evolución de los vertebrados siendo las zonas críticas las que comprenden los puentes disulfuros y los terminales amino y carboxilo de la cadena A y los grupos terminales carboxilos y los residuos hidrofóbicos de la cadena B. Probablemente sean partes esenciales para crear y mantener la estructura tridimensional necesaria para que sea reconocida por sus receptores (37). La naturaleza peptídica de la insulina tiene importantes implicaciones para el tratamiento sustitutivo con insulina exógena ya que no se puede administrar por vía oral al ser destruida por los enzimas digestivos.

En 1967 Steiner y Oyer (38) mostraron la primera evidencia de la existencia de un precursor, la proinsulina. En la actualidad sabemos que también existe un precursor de la proinsulina, la pre-proinsulina con sus primeros 24 aminoácidos formando un péptido señal que permite la entrada de la molécula al retículo-endoplásmico perdiéndose en el proceso para dar lugar a la proinsulina. Una vez allí, sufre un plegamiento para facilitar la formación de los dos puentes disulfuro que unen las cadenas A y B. Posteriormente, mediante un proceso adenosín trifosfato (ATP)-dependiente, la molécula de proinsulina es trasladada al aparato de Golgi y almacenada en gránulos secretores. La conversión de proinsulina a insulina tiene lugar en dichos gránulos gracias a reacciones mediadas por la acción de endoproteasas (39) y allí queda almacenada hasta que lleguen los estímulos secretores (Figura 5).

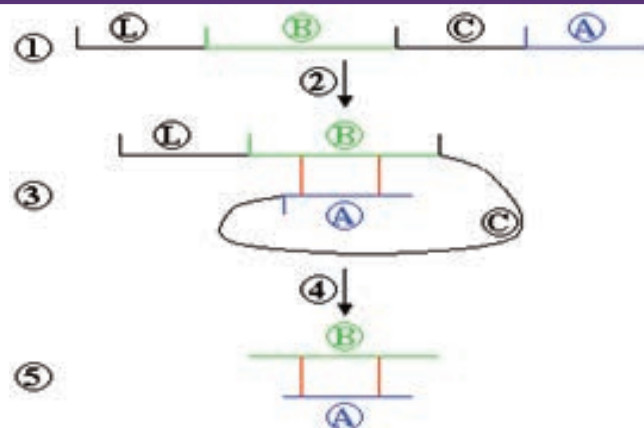


Figura 5. Esquema de la formación de la insulina a partir de la preproinsulina. 1. Preproinsulina (Lguía + cadena B + cadena C + cadena A); proinsulina consiste en las cadenas B + C + A, sin la Lguía; 2. Plegamiento espontáneo; 3. Las cadenas A y B son unidas por puentes sulfuros; 4. La cadena Guía y la cadena C son cortadas; 5. Insulina (<https://es.wikipedia.org/wiki/Insulina>, acceso libre)





La preproinsulina, precursora de la insulina, es codificada por el gen INS (40), localizado en el cromosoma 11p15.5. Se han identificado una variedad de alelos mutantes en la región que codifica al gen. También se han descrito varias secuencias reguladoras a nivel de la región promotora del gen de la insulina humana sobre la cual se unen los factores de transcripción. En general, se sabe que las cajas A se unen a factores Pdx1, que las cajas E se unen a NeuroD, las cajas C sobre MafA y que las secuencias denominadas elementos de respuesta al cAMP se unen sobre los factores de transcripción CREB. En la actualidad se conoce que la glucosa participa en el control de la expresión del gen de la insulina a través de los tres factores de transcripción ya comentados (Pdx1, Neuro D y MafA). Estos tres factores activan la expresión de la insulina de forma coordinada y sinérgica en respuesta al aumento de los niveles de glucosa. La cantidad de proinsulina sintetizada está controlada por numerosos factores como algunos nutrientes, en particular la glucosa, neurotransmisores y hormonas. Efectivamente, el metabolismo de la glucosa es necesario para generar la señal intracelular que estimula la biosíntesis de insulina tanto a nivel de traslación como de transcripción génica (41).

Cambios en las concentraciones de glucosa modulan la función de estos factores de transcripción e a distintos niveles: cambios en los niveles de expresión, localización subcelular (p.ej. translocación), fosforilación, unión al ADN, capacidad de unirse a otras proteínas. Se han descubierto también varios silenciadores genéticos que inhiben la transcripción de la insulina, como desacetilasas de histonas HDCA1 y HDCA2 (41).

Existen otras sustancias capaces de estimular también la biosíntesis de insulina, pero generalmente son menos eficaces que la glucosa. Ciertas hormonas también estimulan específicamente la síntesis de insulina, como la hormona de crecimiento, el glucagón y el "*Péptido similar al glucagón 1*" (GLP1). El glucagón y el GLP1 lo consiguen a través de la vía del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Por otro lado, la somatostatina se comporta como un potente inhibidor de la secreción de insulina, pero no tiene efecto sobre la síntesis, mientras que el interferón inhibe la síntesis, pero a concentraciones muy altas. Caso curioso es el de la interleucina 1, que es capaz de estimular o inhibir la síntesis dependiendo de las concentraciones utilizadas (42). Hay, además, una serie de situaciones fisiológicas en las que la biosíntesis de proinsulina está aumentada como en el caso del embarazo o la obesidad, pero asociadas a un aumento de la masa celular e hiperplasia de los islotes. En otras situaciones como la edad avanzada, periodos de ayuno o en algunos modelos de diabetes mellitus tipo 2 en animales se observa una disminución de la biosíntesis, quizá respondiendo a una pérdida de masa de células  $\beta$  (43).

**Otros nutrientes distintos a los hidratos de carbono.** Los aminoácidos han mostrado sus propiedades como estimulantes de la secreción de insulina, en especial leucina, arginina y lisina. Su efecto es independiente de la presencia de glucosa, pero ésta potencia su acción. Los lípidos y sus metabolitos no parecen ejercer el mismo control, aunque la resistencia a la insulina producida por una exposición aguda, durante 90 minutos, a los ácidos grasos libres se ve compensada por un incremento en la secreción de insulina. Si la exposición persiste, se verían afectados el normal funcionamiento de la biosíntesis y la secreción de insulina (43). Los islotes de Langerhans están inervados por terminaciones nerviosas colinérgicas y adrenérgicas. El sistema parasimpático estimula la secreción de insulina a través de varios neurotransmisores como la acetilcolina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el "*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*" (PACAP, por sus siglas en inglés). Todos ellos actúan incrementando los niveles de AMPc y otros actuando por otras vías. Por otro lado, el sistema simpático disminuye los niveles de insulina en plasma, efecto atribuido a la liberación de noradrenalina y catecolaminas como resultado de la estimulación de la médula adrenal. Como quiera que este sistema también sea capaz de estimular la secreción de glucagón, podemos concluir que ejerce una función de mantenimiento o aumento de la glucemia en condiciones de estrés como neuroglucopenia, hipovolemia o ejercicio físico (44).

**Funciones de la Insulina.** La insulina es el mayor regulador hormonal del metabolismo de la glucosa; de hecho, la función fisiológica y la relevancia clínica de la insulina se observan en asociación con el papel de esta hormona en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (45).

En mamíferos la expresión del gen de la insulina y la biosíntesis de esta hormona están localizados en las células  $\beta$  del páncreas endocrino con la posible excepción del hígado fetal (46, 47). La función primordial de las células  $\beta$  consiste en la producción, almacenamiento y regulación de la secreción de insulina de manera que, en circunstancias normales, siempre existe una reserva de insulina para ser secretada en respuesta a un estímulo, como el incremento de la glucemia. Cualquier aumento de la liberación de insulina se compensa, en proceso dinámico y fuertemente regulado, por el correspondiente incremento en la biosíntesis de la hormona de manera que la reserva se mantiene constante. Sin embargo, la insulina es una hormona anabólica que estimula un gran número de respuestas celulares (45).

La señalización de insulina a través del receptor de insulina involucra varias vías y da como resultado un estado anabólico del metabolismo (Figura 6). La vía canónica a través de las fosfoquinasas PI3K y AKT/PKB promueve la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno y lípidos, mientras que en los adipocitos se inhibe la lipólisis, así como la gluconeogénesis hepática. Además, las quinasas

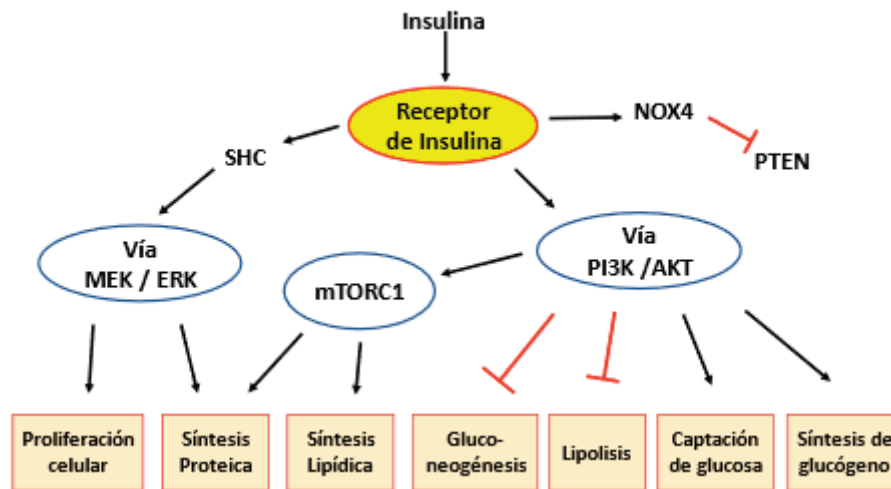


Figura 6. Vías anabólicas mediadas por la insulina. Flechas en negro activación, flecha cortada en rojo inactivación. Modificada de Kolb y col. (45)

AKT activan mTORC1, que respalda la lipogénesis de novo y la síntesis de proteínas. La vía de señalización de la insulina a través de SHC y las MAP quinasas MEK y ERK promueve la proliferación celular y la síntesis de proteínas. Otra vía de señalización de la insulina involucra a NOX4 y la inhibición de PTEN, un inhibidor de la vía PI3K-AKT.

No solo las concentraciones de insulina demasiado bajas, sino también las excesivas, son perjudiciales para el equilibrio fisiológico. Aunque la actividad glucorreguladora de la insulina se mitiga durante la hiperinsulinemia al disminuir la eficiencia de la señalización de la insulina, este no es el caso para la mayoría de las otras acciones hormonales de la insulina, incluida la promoción de la síntesis de proteínas, la lipogénesis de novo y la recuperación celular, la proliferación, la inhibición de la lipólisis, el recambio celular dependiente de la autofagia y la acción antioxidante dependiente del factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2); y otros mecanismos de defensa. Por lo tanto, no hay resistencia general a la insulina, sino un deterioro selectivo de la señalización de la insulina en muchos órganos que provoca una menor captación de glucosa de la sangre y una activación reducida de la NO sintasa endotelial (eNOS) (Figura 7).

Como se observa en la Figura 7, ante la presencia de alteraciones en la señalización de la insulina, la célula- $\beta$  pancreática incrementa su producción de insulina, originándose un hiperinsulinismo inicial con normoglucemia, pero a lo largo de la evolución de la patología se acompaña de glucemia basal alterada, intolerancia a la glucosa y finalmente Diabetes Mellitus tipo 2, situación en la que las células- $\beta$  no responden a la demanda de insulina requerida. A su vez la resistencia a la insulina disminuye de forma marcada la captación de glucosa muscular, lo que induce además incremento de la glucosa hepática por aumento de la glucogenólisis

y síntesis de novo de glucosa. También cuando los niveles de insulina disminuyen, se produce la liberación aumentada de glicerol y AGL al plasma. Todo esto promueve síndrome metabólico, en el cual coexisten obesidad, resistencia a la insulina (RI), hiperglucemia, hipertrigliceridemia, descenso de los niveles de colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDLcolesterol), e hipertensión arterial (48).

Debido a la señalización de insulina en gran medida sin restricciones, la hiperinsulinemia en respuesta a la resistencia a la insulina aumenta el riesgo de obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares y disminuye la duración de la salud y la esperanza de vida.

Los resultados de estudios epidemiológicos sugieren que la terapia con dosis erróneas elevadas se asocia con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Los ensayos controlados aleatorios del tratamiento con insulina no observaron ningún efecto sobre el riesgo de enfermedad, pero estos ensayos solo estudiaron dosis bajas de insulina de hasta 40 UI/día (45). Aunque controvertido, la prueba de un vínculo causal entre los niveles elevados o muy elevados de insulina y el riesgo tras el tratamiento erróneo con insulina proviene de los estudios de aleatorización mendeliana que comparan individuos con una producción de insulina alta o baja controlada genéticamente.

## 6. EPÍLOGO

A pesar de que la insulina y sus análogos han salvado y salvarán muchas vidas, lamentablemente no es accesible para todos los que la necesitan, de hecho, a nivel mundial se estima que solo una de cada dos personas tienen acceso a la insulina que requieren (49). Las dificultades que impiden a las personas ser tratadas con

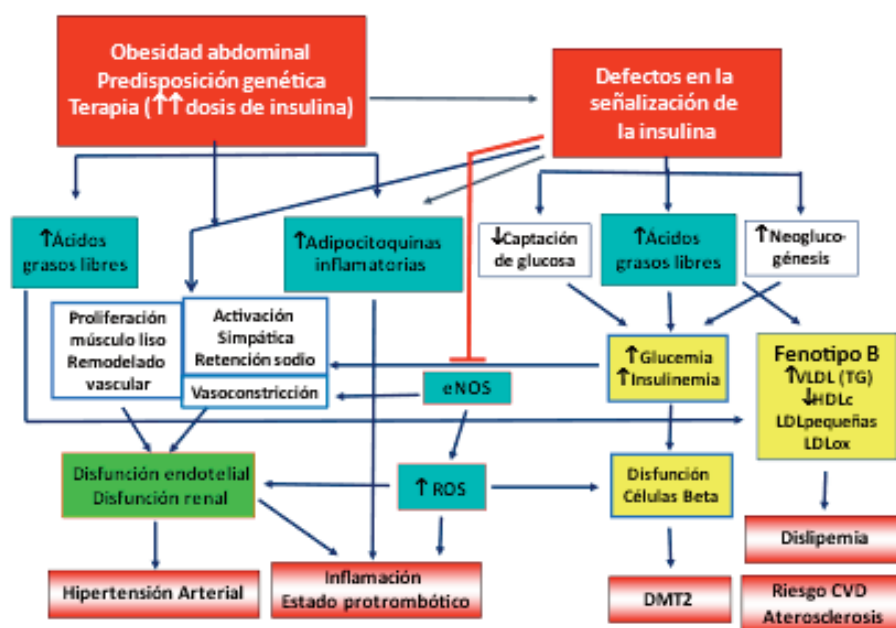


Figura 7. Mecanismos que relacionan la alteración de la señalización de la insulina con la obesidad y con una terapia inadecuada con elevadas dosis de insulina con los componentes del síndrome metabólico (clásicos) y emergentes (inflamación y estado protrombótico y oxidativo). Nótese el papel preponderante del incremento de los ácidos grasos libres en ambas vías. DMT2, Diabetes Mellitus Tipo 2; ROS, Radicales libres; eNOS, sintasa de óxido nítrico endotelial. Modificada de Sánchez-Muniz (48).

insulina son complejos y ocurren tanto a nivel mundial como en España, por lo que aún se requieren cambios y estrategias a nivel social y político para superar estas barreras y lograr el acceso al tratamiento con insulinas de manera universal.

Cabe destacar, que la dificultad al acceso a la insulina no solo es por cuestiones socioeconómicas y políticas, sino también por una creciente ola de mitos que la rodean, haciendo más difícil su implementación. Entre los mitos populares se encuentran que "la insulina provoca ceguera, amputaciones, daños en el riñón y diversas complicaciones", o "si te recetan insulina es porque ya estás en las últimas". Por tanto, la educación y la desmitificación de la diabetes son esenciales, explicando y demostrando que el ser humano necesita insulina para vivir sea o no diabético. Además, debe señalarse que un diabético no produce suficiente insulina o los mecanismos de señalización y utilización de esta por las células no es correcta, apareciendo complicaciones relacionadas con la hiperglucemia durante prolongados periodos de tiempo. Desgraciadamente, es común que el control de la Diabetes sea deficiente y tal deficiencia se prolongue durante años. Por ello el diagnóstico precoz, y el tratamiento de precisión adecuado, considerando el tipo de insulina y su dosificación, deben iniciarse de manera oportuna para evitar desenlaces catastróficos, como ha sido ampliamente demostrado en la práctica clínica y referenciado en la bibliografía relacionada.

En conclusión, los avances en estos 100 años en la terapia con insulina han logrado que la Diabetes haya pasado de ser una enfermedad fatal a una condición crónica manejable. Estos 100 años,

han sido un viaje sensacional, que han permitido la aparición de diferentes tipos de insulina y sus análogos cada vez más adecuados para el tratamiento preciso de los diferentes tipos de pacientes. No obstante, el camino a recorrer sigue siendo largo, ya que muchas personas en todo el mundo aún no tienen acceso a un diagnóstico de la patología y a una atención básica, incluida la administración regular y confiable de la insulina. Por ello no solo son importantes los avances tecnológicos, sino el poder garantizar un acceso responsable equitativo con educación y mejor atención en el cuidado de la diabetes.

## 7. REFERENCIAS

1. Holde E. The Country diary of an Edwardian Lady. Edición Española Observaciones sobre la naturaleza. En: La Felicidad de vivir con la naturaleza. El diario de Edith Holden. Barcelona: Editorial Blume 1979; or Webb & Bower Ltd. Exeter. Inglaterra. 1977.
2. Allen F, Stillman E, Fitz R. Total dietary regulation in the treatment of diabetes. New York: 1919.
3. Sánchez-Muniz FJ. Epílogo. An Real Acad Farm 2016; 82 ( Special Issue); 277-8.
4. Reverte J. Prólogo. En: Reverte J, Puig-Samper MJ, Moreno Martín JM, Vallespín F. (eds.). Expedición Malaespina. Un viaje científico-político alrededor del mundo 1789-1794. Ministerio de Defensa de España, TURNER, 2010, pp. 17-8.
5. Sánchez-Muniz FJ, Culebras J, Vicente Vacas L. En el mes de la con-



- cesión de los Premios Nobel, rendimos homenaje a Alfred Nobel y a los galardonados con el Premio de Fisiología y Medicina de 2021. JONNPR 2021; 7(N): nnn-nn. DOI: 10.19230/jonnpr.4650
6. Flexner A. La utilidad de los conocimientos útiles. En: La utilidad de lo inútil. Manifiesto. Ordina N (ed.): Acatilado: Barcelona, 2013; pp.153-71.
  7. Rincón del vago <https://www.rincondelvago.com/informacion/premios-nobel/>
  8. De Leiva A, Brugués E, de Leiva-Pérez A. The discovery of insulin: Continued controversies after ninety years. *Endocrinol Nutr* (Edición en inglés) 2011; 58 (9): 449-56. (traducción al castellano en <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-el-descubrimiento-insulina-continuan-controversias-S1575092211003172>).
  9. Nobel Foundation. Nobel, the man and his prizes. Oklahoma: University of Oklahoma press. 1951. pp: 221-3.
  10. Bliss M. The discovery of insulin. Chicago: University of Chicago Press. 1982.
  11. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-9937796#:~:text=Frederick%20Banting%20gan%C3%B3%20en%201923,su%20descubrimiento%20de%20la%20insulina>.
  12. Bliss M. The history of Insulin. *Diabetes Care* 1993;16(Suplemento 3):4-7
  13. Lewis GF, Brubaker PL. The Discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. *J Clin Invest* 2021; 131 (1): 1-9.
  14. Molina CE. 100 years of Insulin: Celebrating the past, present and future of diabetes therapy. *Nat Med* 2021; 7:1154-64.
  15. Hegele RA. Insulin's Century. The birth of an idea. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020; 12: 971-7.
  16. IDF diabetes atlas 9th edition. 2019
  17. Barnett, A.H. Preventing renal complications in diabetic patients: the Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril (DETAIL) study. *Acta Diabetol* 2005; 42 (Suppl 1): s42-9.
  18. <https://www.bbc.com/mundo/noticias59937796#:~:text=Frederick%20Banting%20gan%C3%B3%20en%201923,su%20descubrimiento%20de%20la%20insulina>
  19. Biedl A. The internal secretory organs: Their physiology and pathology. London: 1913.
  20. Lancereaux E. La diabète maigre: ses symptômes, son évolution, son pronostic et son traitement; ses rapports avec les alterations du pancréas. *Union Med (Paris)*. 1880; 29: 161-8.
  21. Minkowski O. Historical development of the theory of pancreatic diabetes (introduction and translation by R. Levine). *Diabetes* 1989; 38: 1-6.
  22. Banting F, Best C, Collip J, Campbell W, Fletcher A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *Can Med Assoc J.* (1922);12: 141-6.
  23. Banting F, Best C, Collip J, Macleod J. The preparation of pancreatic extracts containing insulin. *Trans Roy Soc Can.* 1922;5
  24. Kahn CR, Weir GC, King GL, Moses AC, Smith RJ, Jacobson AM. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14 ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2007.
  25. Owens DR, Monier L, Ceriello A, Bolli GB. Insulin Centennial: Milestones influencing the development of insulin preparations since 1922. *Diabetes Obes Metab* 2022; 24(suppl 1): 27-42.
  26. Wait JH, Beetham WP. The visual mechanism in diabetes mellitus: a comparative study of 2002 diabetics and 457 non-diabetics for control. *N Engl J Med* 1935; 212: 429-43.
  27. Kimmelstiel P, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 1936; 12: 83-97.
  28. Bell ET. A postmortem study of vascular disease in diabetics. *Arch Pathol* 1952; 53: 444-55.
  29. Conn JW, Fajans SS. The prediabetic state. A concept of dynamic resistance to a genetic diabetogenic influence. *Amer J Med* 1961; 31: 839-43.
  30. Gavin JR, III; Alberti KGMM, Davidson MB; DeFronzo RA, et al. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 1997; 20(7): 1183-97.
  31. Fineberg S, Galloway J, Fineberg N, Rathbun M. Immunological improvement resulting from the transfer of animal insulin-treated diabetic subjects to human insulin (Recombinant DNA). *Diabetes Care* 1982; 5(Suppl 2): 107-13.
  32. Hall K. *Insulin — the Crooked timber: A history from thick Brown Muck to Wall Street Gold*. Oxford (UK): Oxford University Press. 2022. [www.kerstenhall.com](http://www.kerstenhall.com)
  33. Rhodes CJ, Halban PA. Newley-synthesized proinsulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic beta cells via a regulated, rather than a constitutive, pathway. *J Cell Biol* 1987;105: 145-53.
  34. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature reviews. Mol Cell Biol* 2021;22(Suppl2): 142-58.
  35. García Gil M. El mundo de las insulinas en la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico. En: Sánchez Muniz FJ (director), Martínez Sesmero JM y Marcos Sánchez A. (coordinadores). VI Curso avanzado sobre Obesidad y Síndrome metabólico. Aspectos cardiometabólicos. Cátedra Novo Nordisk-RANF. Madrid: RANF. 2021. pp.55-6.
  36. Conget I, Giménez M. Investigadores del Cibeerdem. De las bombas de insulina al páncreas artificial: el camino para el control de la diabetes tipo 1. 2021. <https://cuidateplus.marca.com/bienestar/2021/11/14/bombas-insulina-pancreas-artificial-camino-control-diabetes-tipo-1-179284.html>
  36. Sanger F. Chemistry of insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* 1959; 129:1340-4.

**Some consideration about insulin one hundred years after its discovery**

Roberto Mediana Santillán, Ángel García Quismondo y Fco. José Sánchez Muniz  
An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 585-601



37. Gammeltoft S. Insulin receptors: binding kinetics and structure-function relationship of insulin. *Physiol Rev* 1984; 64: 1321-68.
38. Steiner DF, Oyer PE. The biosynthesis of insulin and probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 1967; 57: 473-80.
39. Rhodes CJ, Shoelson S, Halban PA. Insulin biosynthesis, processing and chemistry. In: Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. (eds). *Joslin's Diabetes Mellitus*. Boston Diabetes Center, 2005;pp. 65-82.
40. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischler E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 1980; 284 (5751): 26-32.
41. Gil Hernández A, Aguilera García C, Gómez Llorente C. Nutrigenómica. En: Gil A (ed.). *Tratado de Nutrición*. Vol 1. Capítulo 31, Buenos Aires: Panamericana. 2010; Pp 762-764.
42. Guest PG, Rhodes CJ, Hutton JC. Regulation of the biosynthesis of insulin secretory granule proteins: coordinate translational control is exerted on some, but not all, granules matrix constituents. *Biochem J* 1989; 257: 431-7.
43. García-Quismondo Fernández A. Proteína C reactiva, índice de co-nicidad y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con Diabetes tipo 2. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2016
44. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -cell function. *Endocrine Rev* 2001; 22(5): 565-604.
45. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Martin S. Insulin: too much of a good thing is bad. *BMC Med* 2020; 18(1): 224.
46. Orci L. The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. *Diabetologia* 1985; 28: 528-46.
47. Giddings SJ, Carnaghi LR. Selective expression and developmental regulation of the ancestral rat insulin II gen in fetal liver. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1363-9.
48. Sánchez-Muniz FJ. Obesidad central un componente clave del síndrome metabólico. nuevos conceptos. En: Sánchez Muniz FJ (director), Martínez Sesmero JM y Marcos Sánchez A. (coordinadores). VI Curso avanzado sobre Obesidad y Síndrome metabólico. Aspectos cardiometabólicos. Cátedra Novo Nordisk-RANF. Madrid: RANF. 2021. Pp. 9-10.
49. Madrigal Sanroman JR. 100 años de la insulina. <https://www.tierraadentro.cultura.gob.mx/100-anos-de-la-insulina/>

Si desea citar nuestro artículo:

**Algunas consideraciones sobre la insulina cien años después de su descubrimiento**

Roberto Medina Santillán, Ángel García Quismondo  
y Francisco José Sánchez Muniz  
An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 585-601

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.24>





# PRODUCTOS CÁRNICOS SALUDABLES Y FUNCIONALES. EVIDENCIA CIENTÍFICA DEL GRUPO AFUSAN

## HEALTHY AND FUNCTIONAL MEAT PRODUCTS. SCIENTIFIC EVIDENCE OF THE AFUSAN GROUP

Francisco José Sánchez-Muniz<sup>1\*</sup>, Adrián Macho-González<sup>1</sup>, Sara Bastida<sup>1</sup>, Alba Garcimartín<sup>2</sup>, Aránzazu Bocanegra<sup>2</sup>, Amaia Canales<sup>2</sup>, Meritxell Nus<sup>2</sup>, Miguel Vázquez-Velasco<sup>2</sup>, Laura González-Torres<sup>2</sup>, Rocío Redondo Castillejo<sup>2</sup>, Marina Hernández Martín<sup>3</sup>, María Elvira López-Oliva Muñoz<sup>3</sup>, Jorge Arturo Santos<sup>2</sup>, Paloma Celada<sup>4</sup>, María José González-Muñoz<sup>5</sup>, Adriana Rita Schultz Moreira<sup>6</sup>, Juana Benedi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacognosia, Farmacología y Botánica, 3Sección Departamental de Fisiología.

<sup>1,2,3</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid y grupo AFUSAN, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC) de Madrid.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Alfonso X El Sabio, Villanueva de la Cañada, Madrid

<sup>5</sup>Unidad docente de Toxicología, Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid.

<sup>6</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology and Translational Medicine. University Hospital Essen, Alemania

corresponding author: frasan@ucm.es

### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

#### RESUMEN

En la actualidad se considera que el consumo de carne y productos cárnicos es excesivo y predisponente hacia las patologías más prevalentes. Por ello, la obtención de cárnicos con una composición más "saludable" e incluso conteniendo ingredientes bioactivos que los conviertan en funcionales, adquiere relevancia en la salud. Se revisan aspectos generales sobre concepto, métodos de obtención y significación en la salud de los alimentos funcionales. El diseño de un producto cárnico funcional permite modificar la composición nutricional de los cárnicos convencionales y asegurarles una mayor vida útil y estabilidad oxidativa, así como contribuir en los consumidores a mejorar una o varias funciones corporales y reducir el riesgo de enfermedades degenerativas. Se discuten las publicaciones sobre cárnicos funcionales del grupo AFUSAN y de otros investigadores obtenidos a partir de la incorporación a las matrices cárnicas de alimentos completos como nueces o algas, así como de ingredientes de los que existe evidencia científica sobre su papel en la salud: glucomananos, espirulina, hidroxitirosol, aceite de chia, silicio, triglicéridos de diseño con alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, polifenoles procedentes de la pulpa de algarrobo. Los estudios se han realizados en humanos con riesgo cardiovascular elevado (p. ej. sobrepeso/obesidad, dislipemia, hipertensión, consumo de tabaco) y en modelos murinos (ratas Wistar o Zucker fa/fa) en los que se indujo hipercolesterolemia, hígado graso no alcohólico, obesidad, o Diabetes Mellitus tipo 2. Aunque cada ingrediente funcional parece inducir cambios específicos, puede señalarse que en muchos casos estos alimentos funcionales respecto a los convencionales son capaces de ejercer en modelos murinos efectos pleiotrópicos, mejorando el perfil lipoproteico, reduciendo, entre otros aspectos, el estrés oxidativo y la inflamación. En humanos es de destacar resultados relevantes sobre la lipemia, trombogénesis y el estrés oxidativo. La utilización de un extracto de algarrobo como ingrediente funcional de reestructurados cárnicos ejerce efectos plurales en modelos de Diabetes tipo 2 en diferentes estadios de la enfermedad, particularmente en hígado y colon, mejorando en este último órgano, el estatus antioxidante, la integridad de la barrera intestinal y la pluralidad de la microbiota. Estos resultados sugieren los beneficios de sustituir carne y preparados cárnicos convencionales por productos funcionales, que permitan asegurar el aporte de algunos nutrientes de la matriz cárnica y eliminar aquellos que impliquen riesgo para la salud. El trabajo se última planteando líneas futuras de actuación en el marco de una dieta plural, funcional y de precisión.

#### ABSTRACT

*At present, it is considered that the consumption of meat and meat products is excessive and predisposes towards the most prevalent pathologies. Therefore, obtaining meat products with a "healthier" composition and even containing bioactive ingredients that make them functional, acquires relevance in health. General aspects about concept, obtaining methods and current significance in health of functional foods are given. The design of a functional meat product makes it possible to modify the nutritional composition of conventional meat products and ensure a longer shelf life and oxidative stability, as well as helping consumers to improve one or more bodily functions and/or to decrease the risk of suffering degenerative diseases. The publications on functional meat from the AFUSAN group and from other researchers related to the incorporation of whole foods such as nuts or algae into meat matrices, as well as different ingredients for which there is scientific evidence on their role in health: glucomannans, spirulina, hydroxytyrosol, chia oil, silicon, designer triglycerides enriched in  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, polyphenols from carob pulp. Studies have been conducted in humans with high cardiovascular risk (e.g. overweight/obesity, dyslipidemia, hypertension, tobacco use) and in murine models (Wistar or Zucker fa/fa rats) in which hypercholesterolemia, fatty liver, obesity, or Type 2 Diabetes Mellitus was induced. Although each functional ingredient seems to induce specific changes, it can be pointed out that in many cases these functional foods, compared to conventional ones, are capable of exerting pleiotropic effects in murine models, improving the lipoprotein profile, reducing, among other aspects, oxidative stress and inflammation. In humans, relevant results on lipemia, thrombogenesis and oxidative stress should be highlighted. The use of a carob extract as a functional ingredient of restructured meat exerts multiple effects in models of Type 2 Diabetes at different stages of the disease, particularly in liver and colon, improving in this last organ, the antioxidant status, the integrity of the intestinal barrier and the microbiota plurality. These results suggest the benefits of consuming meat and conventional meat preparations for functional products, which ensure the supply of some nutrients via the meat matrix and eliminate those that imply health risks. The work ends by proposing future lines of action within the framework of a plural, functional and precision diet.*

#### Palabras Clave:

cárnicos funcionales  
vida útil  
modificaciones oxidativa  
efectos funcionales  
humanos  
modelos experimentales  
obesidad  
hígado graso no alcohólico  
diabetes tipo 2

#### Keywords:

functional meats  
meat shelf life  
oxidative modifications  
functional effects  
human  
experimental models  
obesity  
non-alcoholic fatty liver disease  
type 2 Diabetes

Productos cárnicos saludables y funcionales.

Evidencia científica del Grupo AFUSAN

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. n.º extra (2022) · pp. 603-626



## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha tenido lugar en el mundo, y en particular en aquellos países con culturas gastronómicas bien establecidas y culturalmente aceptadas, la pérdida de hábitos culinarios y alimentarios tradicionales. Esta transición nutricional se ha acompañado de una transición epidemiológica con aumento marcado de enfermedades crónicas no transmisibles entre las que destacan la aparición en la población de un incremento significativo de sobrepeso y obesidad y de enfermedades relacionadas, con las implicaciones que conllevan sobre la Salud Pública (1-4). Especial importancia presenta este aspecto en el campo de la obesidad infantil entre los que destacan México, en el Continente de América del Norte, y España, entre los países mediterráneos (1, 3).

Este cambio ha estado muy influenciado por la globalización creciente a nivel mundial, que ha inducido fuertes modificaciones en los hábitos de consumo de la población, con un importante incremento del número de comidas realizadas fuera de casa, la incorporación de la mujer al trabajo, la reducción del tiempo disponible y empleado para cocinar y, en particular, para elaborar platos "de cuchara" tan tradicionales de nuestra cultura culinaria. Por último, hay que señalar que también ha tenido lugar un importante aumento del consumo de productos industriales, de embutidos en las cenas, y de alimentos típicos y específicos consumidos en los fines de semana (2). Esta transición nutricional también ha estado marcada por la facilidad de incorporar a productos industriales, grasas culinarias de baratas y de baja calidad; sin olvidar que la grasa, junto con la sal y el azúcar son los tres componentes dietéticos que más incrementan la palatabilidad y, por tanto, la aceptabilidad y consumo de los alimentos (2).

Es por ello por lo que, en la actualidad, los Organismos y Sociedades Científicas se esfuerzan en recuperar aspectos *perdidos* de los hábitos nutricionales, insistiendo particularmente en la recuperación de la dieta tradicional y el incremento de la actividad física (1-5). No obstante, los cambios ocurridos en la forma de comer y la oferta de sistemas que *incitan* a la inactividad se han hecho casi permanentes, por lo que se requieren otras medidas que ayuden a paliar la reducción producida en ciertos compuestos clave de nuestra dieta y que garanticen una alimentación balanceada y más individualizada y optimizada con la finalidad de frenar, la tendencia creciente observada en la incidencia y prevalencia de enfermedades degenerativas y en particular de obesidad y sus comorbilidades relacionadas. La OMS (5) mostró su enorme preocupación al respecto creando el Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020, que se planteaba la reducción relativa del 25% en la mortalidad prematura a causa de dichas enfermedades para 2025 y una detención del aumento de la obesidad mundial para coincidir con las tasas de 2010.

Desafortunadamente, y aunque ha sido una situación transitoria, es destacable que en España y en otros países se ha producido, debido al confinamiento por la pandemia COVID-19, incrementos en el peso de la población debidos a cambios en las pautas de consumo y en la actividad física. Así, particularmente durante la primera "ola", se produjeron cambios en el consumo de alimentos en los hogares con incremento de la cantidad de todos los grupos de alimentos, pero en especial de bebidas alcohólicas, huevos, aceites y grasas, legumbres, azúcar y dulces (6,7), que ha supuesto un incremento medio de consumo de energía durante el periodo de marzo a mayo de 545 kcal/persona/día respecto a los mismos meses del año 2019 (6).

## 2. CONCEPTO DE ALIMENTOS FUNCIONALES

En las culturas orientales, principalmente en la china y japonesa, existe una larga tradición de atribuir propiedades curativas y terapéuticas a los alimentos (8). Los términos "alimento medicinal" y "alimento especial" fueron frecuentemente utilizados en las prácticas médicas de la dinastía Este Han (siglo I y II a. C.) y de la dinastía Song (circa año 1000 d. C.). Hipócrates, en el Siglo V a.C., ya recomendaba que "*el alimento sea tu medicina y la medicina tu alimento*" iniciando los primeros pasos de una nueva filosofía relacionada con la alimentación y los hábitos de vida. De hecho, la medicina tradicional considera que promover la salud y evitar las enfermedades a través de prácticas dietéticas adecuadas, es más importante que tratar al propio enfermo (9).

Desde hace menos de una centuria, la nutrición ha ido evolucionado hasta la actualidad, pasando por diferentes etapas en las que se ha ido garantizando una *Nutrición clásica* que pretendía la reducción de las enfermedades producidas por carencias nutricionales mediante el establecimiento de las ingestas recomendadas o RDA, pasando por una *Nutrición segura y preventiva*, con la aparición de listas de aditivos permitidos y los Codex Alimentarios. Posteriormente, se planteó la conveniencia de una *Nutrición óptima*, dado el incremento en la prevalencia de enfermedades degenerativas, basada en las DRI (del inglés, dietary recommended intakes) o ingestas dietéticas de referencia, que abarca a su vez la implementación de ingestas adecuadas, ingestas máximas tolerables, guías nutricionales y objetivos nutricionales. En la actualidad, la nutrición se ha convertido en *Nutrición funcional*, intentando explotar al máximo el potencial positivo-preventivo de los alimentos, en el marco de una nutrición balanceada, completa y preventiva en la que lejos de prohibir ciertos alimentos, se induzca la mejora en su producción y la incorporación de ingredientes que aporten funcionalidad y ayuden a reducir el riesgo de sufrir enfermedades crónico-degenerativas. Esta optimización de la dieta pasa por respetar,



Figura 1. Evolución de la Ciencia de la Nutrición en las últimas décadas. Modificado de Celada y Sánchez-Muniz (10).

en la medida de lo posible, la individualización y la optimización de la misma, considerando la posibilidad de una alimentación funcional y las peculiaridades individuales de la genética, epigenética, y metagenética. Esto nos lleva en último lugar al concepto actual de la *Nutrición de Precisión* (10) (Figura 1).

El interés actual por los alimentos funcionales se inició en Japón, entre otras causas por el incremento de alergias a los alimentos, la incidencia de cáncer de colon en la población nipona y el rápido aumento de los costos del sistema de salud que tuvieron lugar después de la II Guerra Mundial. En 1984, bajo los auspicios del Ministerio Japonés de Educación, Ciencia y Cultura, surge el primer Programa Nacional sobre Alimentos Funcionales. En 1990, como resultado de un informe del Comité de Estudios de los Alimentos Funcionales, el ministerio Japonés de Salud y Bienestar emitió un decreto por el cual se aprobaron los "Alimentos de Uso Específico para la Salud". A partir de ahí surgió una nueva gama de alimentos que se acogieron bajo la denominación de FOSHU (*Foods for Specific Health Use*) (9,10).

Los FOSHU o Alimentos de Uso Específico para la Salud, en español, son "alimentos que tienen un impacto positivo en la salud, el rendimiento físico, o el estado de ánimo, además de su propio valor nutritivo". Una vez autorizados podrán incluir en el etiquetado una alegación o declaración que exponga que de su ingesta se puede esperar un beneficio sobre su salud. Las autoridades japonesas añaden que los alimentos FOSHU deben cumplir tres condiciones: a) Contener ingredientes de origen natural y en ningún caso se presentarán bajo una forma farmacéutica (comprimidos, cápsulas o polvos); b) Ser consumidos como parte de la dieta diaria y c) Su ingesta implica una mejora o regularización de un proceso o mecanismo biológico concreto para así prevenir o controlar una enfermedad específica (9).

El interés por los alimentos funcionales en Europa y Estados Unidos es algo más reciente que en Japón. A partir del incremento de evidencia científica sobre los componentes minoritarios de los alimentos y el aumento de la prevalencia de enfermedades degenerativas, tuvo lugar el inicio de la obtención y comercialización de los alimentos funcionales. No obstante, no es hasta 1994 cuando la *American Dietetic Association* (ADA) apoya por primera vez el estudio y existencia de alimentos funcionales. En 1995 se celebró la Primera Conferencia Internacional sobre perspectivas Oriente-Occidente de los alimentos funcionales, cuya misión fue recoger la información disponible y unificar perspectivas del mundo Occidental y Oriental sobre este tema (8). Posteriormente, organismos como el Parlamento Europeo, mostraron una amplia preocupación sobre el asesoramiento científico en términos de seguridad y la necesidad de una mayor interacción entre este asesoramiento y el interés de los consumidores. En el año 1998 se elaboró un documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales. En él participó el Comité de Expertos de la *Functional Food Science Europe* (FUFOSE) con la asesoría del *International Life Science Institute Europe* (ILSI Europe). En ese documento se define a un alimento funcional como "El alimento que contiene uno o más componentes, nutrientes o no nutrientes, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con efecto fisiológico por encima de su valor nutricional, y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable" (11). En la actualidad, desde el 20 de diciembre de 2006, existe en la Europa Comunitaria una reglamentación en la que se recogen las normas y criterios que deben seguir y reunir un alimento para conseguir la denominación de Funcional y poder incluir en su etiquetado declaraciones de salud (12).



Actualmente en los Estados Unidos de Norteamérica no existe una definición universalmente aceptada para Alimentos Funcionales. No obstante, un alimento funcional es definido comúnmente como un alimento que provee beneficios más allá de la nutrición básica proporcionada por dicho alimento, ejerciendo el Bureau Federal Americano (FDA) como autoridad indiscutible para la aceptación legal de este tipo de alimentos (13).

### 3. TIPOS DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Un alimento funcional debe ser similar en apariencia a un alimento convencional y sus efectos fisiológicos beneficiosos sobre la salud han de estar demostrados. Por tanto, un alimento funcional puede ser natural o transformado mediante tecnología o biotecnología, pero siempre deben existir evidencias científicas que avalen su efecto funcional sobre sujetos con unas determinadas características patológicas o previas que les predispongan a padecer una enfermedad. Es importante insistir en que la constatación científica de dichos efectos beneficiosos no solo ha de basarse en resultados estadísticamente significativos, sino que ha de poseer relevancia desde el punto de vista clínico.

Bajo ese punto de vista los alimentos funcionales se clasifican en:

Funcionales "*per natura*" (p.ej. agua, aceite de oliva virgen o virgen extra, pescado graso, nueces).

Funcionales para adaptar a alimentación especial.

En ellos se encuentran:

- b1) Alimentos para alimentación enteral y parenteral
- b2) Alimentos para alergias e intolerancias
- b3) Por modificación de la textura (p.ej. beikost).

Por modificaciones mayores: composición, funcionalidad.

En ellos se encuentran:

- c1) Alimentos modificados y "mejorados"
- c2) Complementos nutricionales
- c3) Dietéticos
- c4) "Novel Foods".

La gran mayoría de alimentos funcionales se encuentra dentro del apartado "c1" de la clasificación anterior; no obstante, la información muchas veces es dispar y no muy específica a la hora de incluir como alimentos funcionales a los nutracéuticos, complementos y suplementos o a ciertos alimentos "nuevos" (p. ej. alimentos transgénicos, alimentos basados en alimentos no convencionales).

En los Estados Unidos de Norteamérica, los alimentos funcionales se pueden clasificar en dos amplias categorías. La primera consiste en alimentos funcionales que naturalmente contienen un componente que ofrece beneficios adicionales al consumidor; la se-

gunda en alimentos procesados en el que el componente se añade al alimento para darle beneficios adicionales (13).

También los alimentos funcionales pueden clasificarse atendiendo a sus efectos:

- a) Mejorar una o varias funciones corporales
- b) Reducir el riesgo de padecer enfermedades degenerativas
- c) Ambas cosas.

Una tercera clasificación surge al catalogarlos dependiendo de las funciones específicas y/o generales para las que se diseñan, las cuales se resumen en siete grandes grupos de alimentos funcionales definidos por FUFOSY y comentados por Aranceta Bartrina (14).

Con efectos sobre funciones conductuales y psicológicas; b) Que pueden mejorar las funciones gastrointestinales; c) Que optimizan el crecimiento, el desarrollo y la maduración; d) Que regulan el metabolismo de los macronutrientes y la homeostasis corporal; e) Que pueden actuar mejorando la defensa contra el estrés oxidativo; f) Que pueden actuar disminuyendo el riesgo de enfermedades cardio- y cerebro-vasculares; g) Que mejoran el rendimiento y el buen estado físico.

No obstante, debemos señalar que existen claros solapamientos entre algunas funciones clasificadas en grupos diferentes (p. ej. propiedades cardiovasculares, regulación del metabolismo, defensa contra el estrés oxidativo), por lo que en algunos casos puede decirse que algunos alimentos funcionales, o los ingredientes que incorporan, pueden tener multifunción y ser válidos para mejorar o normalizar diferentes aspectos de nuestra economía corporal.

### 4. OBTENCIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Entre los procesos más habituales para elaborar alimentos funcionales se encuentran: a) Selección genética para obtención de animales o vegetales con una composición potencialmente más adecuada para la salud (p.ej. reducción del contenido de grasa en la carne de consumo procedente de diferentes animales, modificación de una ruta metabólica para asegurar la presencia elevada o disminuida de uno o varios compuestos, b) alimentación animal con dieta con un contenido mejorado de alimentos que aseguren salud y bienestar animal y (p.ej. con aporte en su dieta de un contenido óptimo de vitaminas, que asegure mayor retención de vitaminas por los tejidos animales, alimentos OVN (de *Optimum vitamin nutrition*); y c) reformulación de alimentos (9,10,15)

La industria actual trabaja de forma incansable para poder enfrentarse al reto de poder ofrecer alimentos más saludables mediante la reformulación. Esta estrategia es mucho más rápida



**ALIMENTO TRADICIONAL**



**Eliminación** de un componente con efectos fisiológicos negativos

**Aumento** de la concentración de un componente con efectos fisiológicos beneficiosos

**Adición** de un componente con efectos fisiológicos beneficiosos

**Sustitución** parcial de un ingrediente con efectos negativos por otro con efectos beneficiosos

**Modificación de la biodisponibilidad** del ingrediente funcional

**ALIMENTO FUNCIONAL**



Figura 2. Fases o pasos mediante los cuales puede obtenerse un alimento funcional a partir de un alimento tradicional o convencional. Modificado de Celada y Sánchez-Muniz (10).

que la intervención en la producción animal e incide directamente en el alimento que va a ser consumido. La reformulación de alimentos consiste en alterar la composición de los mismos optimizando el contenido de los componentes de los que existe evidencia científica de sus beneficios para la salud y/o limitando el de aquellos que puedan tener una influencia negativa para la misma. De una manera esquemática (Figura 2) se podría resumir que la obtención de un alimento funcional (10,15) parte de un alimento tradicional que es modificado mediante los siguientes posibles procedimientos:

1. Eliminar algún componente al que se atribuyen efectos fisiológicos adversos
2. Aumentar la cantidad de un componente con efectos fisiológicos beneficiosos
3. Adicionar un componente con efectos fisiológicos positivos
4. Sustituir parcialmente un ingrediente con efectos adversos por otro con efectos beneficiosos
5. Aumentar la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes para mejorar la asimilación de un componente beneficioso
6. Mezcla de algunos de los puntos anteriores.

A estas posibilidades derivadas de la modificación o reformulación de los alimentos, hay que añadir las ya discutidas en los apartados anteriores, en las que se incrementan o reducen algunos componentes de su composición, gracias a condiciones especiales de cultivo, crianza o procedimientos biotecnológicos.

Se ha de tener en cuenta que un alimento funcional no es siempre un producto nuevo. Es necesario, también, diferenciar entre un alimento enriquecido y un alimento funcional. En España, la categoría de los suplementos alimentarios o dietéticos se considera más próxima a la farmacología que a la nutrición y no se incluye dentro de los alimentos funcionales. Sin embargo, hay que consi-

derar que estos productos se venden en muchas ocasiones fuera de las farmacias, con lo que adquieren una categoría intermedia, no siendo reconocidos como medicamentos.

## 5. CONSUMO ACTUAL DE CARNE Y DERIVADOS. RELACIÓN CON LA MORTALIDAD TOTAL Y ATRIBUIBLE A ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES

Los patrones globales de hábitos alimentarios revelan que tanto la producción como el consumo promedio per cápita de carne a nivel mundial están aumentando notablemente (58% mayor consumo en 2020 que en 1970), siendo más elevado en los países industrializados (16), y que permiten establecer una relación positiva entre el nivel de ingresos y el consumo de proteína animal (16-18). Utilizando datos promedio del consumo de carne a nivel mundial, se estima que cada persona consume alrededor de 120 g /día (19), de los cuales un tercio es carne de cerdo y aves de corral, un quinto es carne de res y el resto procede de otras fuentes, como carne de oveja o cabra (19). Este incremento viene dado en su mayoría por el mayor consumo observado en países con ingresos medios, especialmente en China y Asia Oriental; aunque simultáneamente parece existir una estabilización o incluso una ligera disminución del consumo en los países de con altos ingresos (16,19).

En España el consumo total es aproximadamente de 147 g/por cabeza y día, correspondiendo 107,2 g al de carnes frescas, 35,4 g al de transformadas y 3,2 g al de congeladas, con un consumo dispar entre comunidades autónomas en lo referente al tipo y procedencia de la carne y sus productos (20).

Se define por carne la parte comestible de los músculos de bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos, sanos, sacrificados en condiciones higiénicas. Por extensión se incluyen tam-



bién animales de corral, cazas de pelo y pluma y mamíferos marinos. Dentro del apartado carne se han de considerar los despojos que según el Reglamento del Parlamento Europeo de 2004 son las partes comestibles que se extraen de los animales y que no están consideradas dentro del término canal (21).

La carne está constituida mayoritariamente por agua (60-80%), proteínas (16-25%) (aproximadamente el 40% de sus aminoácidos son esenciales) y grasas (1-30%). Su contenido en hidratos de carbono es casi inexistente, debido a que el glucógeno de los músculos desaparece casi por completo durante el proceso de maduración. En la carne se encuentran pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, creatina, nucleótidos, etc.) y ácido láctico. También hay cantidades relativamente elevadas de algunas vitaminas (tiamina, niacina, retinol y B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>) y pequeñas cantidades de vitamina D. Entre los minerales destacan el contenido de hierro hemo y de zinc de alta biodisponibilidad, los niveles de fósforo, selenio, sodio, potasio y cobalto (15,18,22). La composición de la carne varía en función del tipo de alimentación del animal, edad, zona de la canal, etc., de ahí que cualquier generalización puede ser errónea (20). Respecto a los productos cárnicos, la composición difiere dependiendo del tipo de producto, de los componentes que la integran y de las materias primas utilizadas en su elaboración. En general contienen más grasa y menos proteínas que la carne de consumo directo y su contenido mineral aumenta al adicionarle sales para su conservación y elaboración. La riqueza en ácido linoleico depende de la presencia de tocino de cerdo y, si se utilizan como ingrediente vísceras y despojos de bajo precio, se reduce el aporte de aminoácidos esenciales. El contenido vitamínico es dependiente de las materias primas utilizadas y del proceso de elaboración, reduciéndose por lixiviación en las salazones y en los productos cocidos. Los embutidos de carne de cerdo son más ricos en tiamina, mientras que las pastas de hígado lo son en retinol y vitamina A (22).

Con el nombre genérico de derivados cárnicos se designa a los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o despojos de las especies autorizadas (en España por el Código Alimentario) (21). La mezcla de estos ingredientes, elaborados mediante salazón, deshidratación, cocción o sus combinaciones da lugar a la aparición de nuevos productos más agradables a la vista y al paladar. Se clasifican en a) salazones, ahumados, adobados; b) tocinos; c) embutidos, charcutería y fiambres; d) extractos y caldos de carne, y e) tripas. La palabra embutido se aplica a todo producto preparado a base de carne y grasa picadas, en general de cerdo, mezcladas con condimentos y especias, cuya masa se introduce en tripas, naturales o artificiales (tubos extruidos de colágeno regenerados, materiales celulósicos o películas plásticas). En España se denominan "cocidos" cuando reciben tratamiento térmico, en oposición

a todos los demás que se designan como "crudos" "frescos" o "curados", según el tiempo de maduración—desección que han recibido. Al margen de un posible tratamiento en secadero, en la mayoría de los países de la UE, se califica al producto cárnico curado al que ha recibido la acción de nitritos (19) (23).

La carne y los productos cárnicos, a pesar de ser una buena fuente de nutrientes, presentan ciertos componentes que en exceso se consideran perjudiciales para la salud, como los ácidos grasos saturados (AGS) y el colesterol y también el contenido de nitratos, nitritos, y nitrosaminas (22,24,25). De hecho, varias revisiones recientes han establecido una relación entre el consumo de carne roja y procesada y un mayor riesgo de ciertas enfermedades crónicas, principalmente enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (22,24-27). En particular y respecto al cáncer, entre los compuestos o componentes considerados como candidatos por haberse encontrado alguna posible relación epidemiológica con el cáncer, se encuentran los nitratos, los nitritos, las aminas heterocíclicas, los hidrocarburos policíclicos aromáticos, el contenido de hierro hemo y la insaturación. También se ha señalado, a la presencia o formación de ácido siálico de bacterias, a la formación de trimetilaminas por fermentación por la microbiota, y a la interacción con los ácidos biliares a nivel digestivo (15,22,24,28). No obstante, hay que tener presente que los estudios transversales que se realizan en un determinado momento no pueden relacionar causa y efecto por sí solos. Es decir, que haya correlación entre mortalidad y consumo de un alimento, no implica causalidad, ya que otros muchos factores de estilo de vida diferentes al consumo de carne roja pueden contribuir a este resultado (29).

Este hecho fue postulado por Hill hace 50 años, enumerando nueve tipos distintos de evidencias que podrían ayudar a reafirmar los resultados de los estudios observacionales; estos postulados siguen gozando de buena consideración. Los nueve tipos de evidencias incluyen: fuerza, que Hill creía que era, con mucho, la más importante, consistencia, especificidad, temporalidad, gradiente biológico, verosimilitud, coherencia, experimentación y analogía (30). Los postulados de Hill son aceptados y considerados tanto por aquellos que están a favor como por los que están en contra de utilizar solo los estudios observacionales para obtener conclusiones sobre la causalidad.

También se ha señalado que algunos componentes, como los oxisteroles y los nonenales, pueden originarse durante el almacenamiento y la cocción, así como durante la digestión y el metabolismo (28,31,32). Tras una comida a base de productos cárnicos ricos en lípidos y proteínas, se ha encontrado un aumento de la susceptibilidad al daño oxidativo corporal (24,27,31,33). Además, hay consenso que, tras el consumo de alimentos oxidados, tanto por animales como en humanos, se produce aumento de los compuestos

de oxidación en el plasma [p.ej. malondialdehído (MDA), productos finales de glicosilación avanzada, 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), oxisteroles o carbonilos proteicos] (28). También se ha definido que el estómago actúa como biorreactor a pH bajo y en presencia de oxígeno, aumentando la oxidación de lípidos y proteínas, con mayor formación de MDA e hidroperóxidos (28,32,33), junto con la oxidación de otros componentes como la vitamina E y los  $\beta$ -carotenos (34). Por otra parte, en el estómago, la mioglobina se desnaturaliza e hidroliza, liberando hierro que puede actuar como pro-oxidante (31). Tras la digestión, los lípidos oxidados son absorbidos, incluidos y transportados por los quilomicrones, aumentando el estrés oxidativo en diferentes tejidos y activando la respuesta inflamatoria (35). Por todo ello, se ha planteado la hipótesis de que las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los lípidos oxidados generados durante la digestión también pueden contribuir a la oxidación de las proteínas de la carne y a sus efectos potencialmente negativos (31).

## 6. PRODUCTOS CÁRNICOS SALUDABLES Y FUNCIONALES. DISEÑO Y DESARROLLO

Como hemos comentado en el apartado "Obtención de Alimentos Funcionales" la reformulación de alimentos o productos cárnicos funcionales, es la forma más utilizada para eliminar, reducir, aumentar, agregar y/o reemplazar diferentes componentes bioactivos (9,15,18) (Figura 2). Por tanto, la amplia aceptación de los productos cárnicos por los consumidores y su "plasticidad tecnológica" como matriz para incorporar y vehiculizar componentes bioactivos, los convierte en una clara opción para el desarrollo de alimentos funcionales.

Teniendo en cuenta estas premisas, parece plausible diseñar carnes funcionales que puedan minimizar los procesos oxidativos en todas las fases posibles (Figura 3), desde su producción hasta las fases finales del metabolismo de sus ingredientes, así como influenciar positivamente sobre otros aspectos de la salud y contribuir a frenar el desarrollo de enfermedades degenerativas.

No obstante debemos señalar que para su desarrollo, es necesario que se cumplan los siguientes aspectos esenciales: la selección y caracterización de componentes bioactivos, el diseño tecnológico, el desarrollo del alimento y la evaluación de factores que modifican su contenido/biodisponibilidad; y por último, y más importante, la evaluación del efecto funcional utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* que proporcionen información sobre los mecanismos de acción, relación dosis-respuesta y efectos agudos y crónicos sobre diferentes aspectos fisiológicos que interviene en la salud (11,13-15,18).

## 7. PAPEL DE LOS CÁRNICOS FUNCIONALES PARA EJERCER EFECTOS SALUDABLES Y REDUCIR EL RIESGO DE SUFRIR DE ENFERMEDADES CRÓNICAS EN LOS CONSUMIDORES

Desde un punto de vista práctico, las enfermedades se clasifican normalmente según su localización o por la presencia de mecanismos fisiológicos específicos alterados. Así pues, los alimentos funcionales o sus ingredientes también podrían clasificarse según sus mecanismos de acción y sus efectos específicos y/o sistémicos demostrados en estudios clínicos o preclínicos (15,36,37). La mayoría de las enfermedades crónicas no transmisibles prevalentes tienen

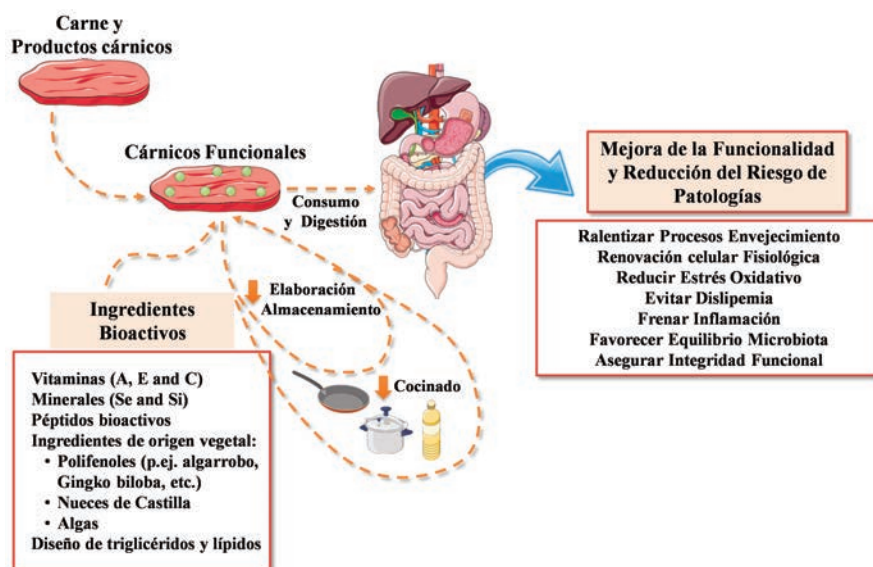


Figura 3. Esquema de integración. La carne y los productos cárnicos aparecen como matriz adecuada para incorporar ingredientes bioactivos o funcionales. Los ingredientes funcionales contribuyen a minimizar las alteraciones de los alimentos (organolépticas, oxidativas, lixiviación) durante su elaboración, almacenamiento, cocinado y digestión. Estos ingredientes, interaccionando o no con los de la matriz, ejercerían sus efectos nutricionales y de mejora de la funcionalidad reduciendo el riesgo de enfermedades degenerativas, cuya base es eminentemente oxidativa y relacionada con el envejecimiento. Modificada de Macho-González y col. (15).



un origen común basado en factores prooxidantes/inflamatorios (28, 37); sin embargo, hasta la fecha, la evidencia científica sobre los efectos antioxidantes y de otra índole inducidos por los productos cárnicos funcionales en modelos animales, es relativamente escasa, limitándose la información disponible a hígado y plasma, disponiéndose de mucha menos información sobre sus efectos a nivel del páncreas, cerebro, riñones, bazo, corazón, músculo esquelético, etc.

Asimismo, en los seres humanos la evidencia sobre los efectos de los productos cárnicos funcionales se reduce al plasma, orina y heces, en los que se analizaron la mayoría de las veces marcadores rutinarios (colesterol, lipoproteínas, índice redox, actividades de enzimas antioxidantes en plasma, interleucinas) (15).

Nuestro grupo de investigación Nutrición y Salud Cardiovascular de la UCM, referencia #920536 que responde al acrónimo de AFUSAN, de Alimentación, Funcional, Salud y Nutrición), en colaboración con el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España ha diseñado cárnicos funcionales a los que se han incorporado diferentes ingredientes funcionales como: nueces, algas, glucomanano, espirulina, silicio, hidroxitirosol, y aceite de chia (15,18,36,38-43). Más recientemente el grupo AFUSAN ha investigado en la incorporación a productos cárnicos de triglicéridos de diseño enriquecidos en ácido oleico y ácidos grasos poliinsaturados (AGP)  $\omega$ -3 (44-46), así como de extractos de algarroba, rico en fibra insoluble y proantocianidinas y sus efectos sobre la salud (15,47,48) (Tabla 1).

Como puede observarse en la Tabla 1 los estudios se realizaron tanto en humanos con varios factores de riesgo cardiovascular (edad, sobrepeso/obesidad, colesterol, hipertensión, tabaquismo) como en animales de experimentación en los que se provocó hipercolesterolemia experimental, hígado graso no alcohólico o DMT2 en ratas Wistar en crecimiento o envejecidas o en modelos genéticamente predispuestos (ratas Zucker fa-fa) en las que se inducía obesidad y resistencia elevada a la insulina. En las siguientes secciones se expondrá de forma detallada los resultados más relevantes obtenidos por el grupo AFUSAN con diferentes tipos de cárnicos funcionales.

### 7.1. Productos cárnicos conteniendo pasta de nuez

Las nueces (*Juglans regia*, L.), presentan algunas características diferenciales en su composición respecto a otros frutos secos. Así, son ricas en arginina (38,49,50) un aminoácido precursor del óxido nítrico con efecto vasodilatador antiinflamatorio endógeno e inhibidor de la agregación plaquetaria, lo que explica, al menos parcialmente, los efectos cardiovasculares protectores del consumo de este fruto seco (49-51). También las nueces contienen minerales antioxidantes como el magnesio, el selenio, el cobre y el zinc

(38,50,51), cantidades notables de vitaminas antioxidantes (p. ej.,  $\gamma$ -tocoferol), polifenoles (p. ej., quercetina) y esteroides vegetales (p. ej.  $\beta$ -sitosterol) (38,51). Además, su contenido en ácido  $\alpha$ -linolénico (AGP  $\omega$ -3) es muy superior al de otros frutos secos. Este aspecto es importante, ya que los AGP  $\omega$ -3 inducen una menor expresión y actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2) que sus homólogos los AGP  $\omega$ -6, e incluso producen resolución de la inflamación a través de compuestos como las maresinas, resolvinas y neuroprotectinas (52).

A pesar de sus propiedades, el consumo de nueces en el mundo es reducido y casi se restringe su uso a repostería. Por tanto, para promover su consumo, y aprovechar sus propiedades saludables, las nueces podrían utilizarse como ingrediente funcional en alimentos de alto consumo (p. ej. la carne/los productos cárnicos). Esta adición convertiría a los productos cárnicos en más saludables (15,18,38). Debido a las diferencias específicas con respecto a otros frutos secos (50,51), las nueces se seleccionaron por el grupo AFUSAN para ser incluidas en la carne de ternera. Este enfoque permitió que sujetos con elevado riesgo cardiovascular consumieran, por un lado, algunos nutrientes o nutrimentos de los cárnicos como aminoácidos esenciales, hierro y zinc, junto con otros componentes y por otro, nutrientes aportados por las nueces como la fibra dietética, la arginina, los ácidos  $\alpha$ -linolénico,  $\gamma$ -linolénico, y vitaminas como el ácido fólico (38,51). Además, como cualquier alimento funcional, los productos cárnicos que contienen pasta de nuez deben mantener las propiedades saludables del ingrediente incorporado después de su cocción o cocinado. A este respecto, señalaremos que al menos el 80% del ácido  $\alpha$ -linolénico, y de los AGP totales permaneció en la carne enriquecida con pasta de nuez después de la fritura superficial con aceite de oliva (53). También los resultados con otros métodos culinarios señalan la estabilidad y viabilidad de este tipo de cárnicos (54).

Como se resume en la Tabla 1, se realizó un estudio cruzado aleatorizado y controlado con placebo, de cinco semanas de duración en hombres y mujeres con alto riesgo de ECV, para evaluar los efectos funcionales del consumo semanal de filetes reestructurados ( $4 \times 150$ g) y salchichas (150g) que contenían un 20% de pasta de nuez. Los niveles de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como el colesterol transportado por las LDL (LDLcolesterol) disminuyeron tras el consumo de cárnicos con nuez respecto al de cárnicos convencionales, sugiriendo una reducción del riesgo cardiovascular (38). Además de los resultados obtenidos en las LDL, se observaron efectos interesantes sobre otros marcadores antioxidantes e inflamatorios, y sobre la concentración de tromboxanos y prostaciclina. Así, la mejora de los niveles de estos eicosanoides (55) sugiere una reducción de la actividad de la COX, una enzima que durante su acción produce (ROS) (56). La ingesta de estos productos cárnicos cinco veces por semana aumentó las con-



**Tabla 1.** Resumen del diseño, población objeto de estudio, tipo de cárnico, dosis edad, dieta y tejidos estudiados por el grupo AFUSAN.

Ingrediente	Especie	Carne/ ingrediente funcional	Dosis	Estudio	Edad	Dieta	Tejido	Referencias
Pasta Nuez	25 hombres y mujeres con 2 factores riesgo CV	Ternera/ reestructura- dos y salchichas (20% pasta nuez)	4x150g filetes reestruc- turados y 150g salchi- chas por semana	Cross-over. Controlado 5 semanas lavado	Adultos	Propia	Sangre	36,38,55, 58,127,128
Nori	Ratas Wistar (20 CF vs. 20 CC)	Cerdo reestructurada (5,6% de Nori seco)	15% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo, controlado 5 semanas. Dislipemia	Crecimiento	AIM-93 modificada. Sin y con colesterol + ácido cólico (2%+0,4%)	Sangre, Hígado Tejido Adiposo, Intestino	39,71,73
Wakame	Ratas Wistar (20 CF vs. 20 CC)	Cerdo reestructurada (5,6% de Wakame seco)	15% cárnico en dieta aterogénica	Paralelo, controlado 5 semanas. Dislipemia	Crecimiento	AIM-93 modificada. Sin y con colesterol + ácido cólico (2%+0,4%)	Sangre, Hígado Tejido Adiposo, Intestino	39,71,73
Espagueti de mar	Ratas Wistar (20 CF vs. 20 CC)	Cerdo reestructurada (5,6% de Espagueti seco)	15% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo, controlado 5 semanas. Dislipemia	Crecimiento	AIM-93 modificada. Sin y con colesterol + ácido cólico (2%+0,4%)	Sangre, Hígado Tejido. Adiposo, Intestino	39,70,72
Glucomanano	Ratas Zucker fa/fa (12 CF vs. 12 CC)	Cerdo reestructurada Glucomanano (2,25%)	15% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo. Controlado 7 semanas. Obesidad	Crecimiento	AIM-93 modificada Sin y con colesterol + ácido cólico 2%+0,4%)	Sangre, Hígado Corazón	40,77,78,80
Glucomanano y espirulina	Ratas Zucker fa/fa (12 CF vs. 12 CC)	Cerdo reestructurada Glucomanano + espiru- lina (2,25% + 0,3%)	15% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo. Controlado 7 semanas. Obesidad	Crecimiento	AIM-93 modificada. Sin y con colesterol + ácido cólico 2%+0,4%)	Sangre, Hígado Corazón	40,77,78,80
Si	Ratas Wistar (8 CF vs. 8 CC)	Cerdo reestructurado Silicio (0,13%)	21,7% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo. Controlado Dislipemia Hígado Graso	Viejas (60 semanas)	AIM-93 modificada. Sin y con colesterol + ácido cólico (1%+0,2%)	Sangre, Hígado, Tejido adiposo Intestino	41,42, 99 100,101
Hidroxitirosol	Ratas Wistar (8 CF vs. 8 CC)	Cerdo reestructurada Hidroxitirosol (0,36%)	21,7% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo. Controlado Dislipemia Hígado Graso	Viejas (60 semanas)	AIM-93 modificada. Sin y con colesterol + ácido cólico (1%+0,2%)	Sangre, Hígado, Tejido adiposo Intestino	42,43
Aceite de chía	Ratas Wistar (8 CF vs. 8 CC)	Cerdo reestructurada Aceite de Chía (1,52%)	21,7% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo Controlado Dislipemia. Hígado graso	Viejas (60 semanas)	AIM-93 modificada Sin y con colesterol + ácido cólico (1%+0,2%)	Sangre, Hígado Tejido adiposo Intestino	43,81
Cambio perfil graso. ~ Grasa Oleico y $\omega$ -3	18 hombres 2 factores de riesgo CV	Salchichas y patés. Reduc- ción de grasa (15%) + AGP $\omega$ -3 (2g por día)	200g salchichas + 250 g patés por semana	Secuencial/ciego Perio- dos de 4 semanas con lavado	Adultos	Propia	Sangre	44,45,46,92
Fibra de algarrobo	Ratas Wistar (8 CF vs. 8 CC) y (16 CF vs.8C)	Ternera/cerdo (1:1) Ex- tracto algarrobo (0,4%)	30% de cárnico en dieta aterogénica	Paralelo. Controlado Diabetes tipo 2 con STZ + NAD	Crecimiento	AIM-93 modificada Sin y con colesterol + ácido cólico (1% + 0,2%)	Sangre, Hígado, Pán- creas, Colon	47,48,115, 119,120,121

CC, cárnico control, CF, cárnico funcional: CV, cardiovascular, STZ + NAD, estreptozotocina más ácido nicotínico

**Productos cárnicos saludables y funcionales.**

**Evidencia científica del Grupo AFUSAN**

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 603-626





centraciones de los enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reducido (GSH) e índice redox dado por el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), y redujo la concentración de lipoperoxidos (LPO) en comparación con la ingesta de los productos cárnicos de contenido graso reducido (36). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que demostraron que las nueces pueden reducir la oxidación sistémica (56) y el estrés oxidativo cerebral (57). Nuestros resultados también denotaron disminución en los marcadores de inflamación y quimiotaxis como leucotrienos de la serie 4, moléculas de adhesión vascular e intercelular (sVCAM e sICAM, respectivamente) (58). Esta intervención dietética de carne enriquecida con nueces aumentó la actividad de la enzima paraoxonasa (PON1) sin modificar los niveles de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDLcolesterol) (36). Todos estos resultados sugieren ampliamente que la mejora del estado antioxidante en los participantes se debió al consumo de carne enriquecida con nueces.

## 7.2. Productos cárnicos funcionales conteniendo macroalgas y microalgas

En la actualidad existe abundante evidencia de que diferentes componentes bioactivos de las algas, tales como la fibra dietética, las proteínas, los macro y microminerales (p. ej. sodio, calcio, potasio, hierro, magnesio, selenio y manganeso), las vitaminas (C y del grupo B), los AGP  $\omega$ -3, los polifenoles, los carotenoides o los tocoferoles pueden ayudar a conseguir mayor estabilidad y a mejorar ciertas propiedades organolépticas de los productos cárnicos (39). También estos componentes ejercen propiedades funcionales en los consumidores (39,59). Sin embargo, debe evitarse cualquier generalización sobre las propiedades de las algas, ya que su composición difiere de unas algas a otras y depende, entre otros factores, de la especie, el hábitat y el estado de maduración (60-62). Además, las algas pueden contener elevadas cantidades de elementos traza tóxicos (p. ej. arsénico) que bloquean parcialmente las propiedades antioxidantes definidas en las algas, al actuar negativamente sobre el sistema del glutatión (63). También es importante diferenciar entre algas enteras frescas, desecadas, y sus extractos, ya que el proceso de extracción de algunos compuestos bioactivos puede determinar la posterior actividad antioxidante, explicando, al menos en parte, la falta de reproducibilidad de resultados entre los estudios (39,64). Nuestro grupo AFUSAN en colaboración con el ICTAN del CSIC de España, ha elaborado diferentes tipos de carne enriquecida con "espagueti de mar" (*Himanthalia elongata*), "wakame" (*Undaria pinnatifida*) o "nori" (*Porphyra umbilicalis*) mediante un sistema de gel/emulsión (39,65). Las publicaciones fruto de esta colaboración señalan que la incorporación de algas a derivados cárnicos (p. ej. salchichas tipo Frankfurt) permite reducir la adición de

cloruro sódico e incluso la demanda de antioxidantes (39,66). También las salchichas, hamburguesas y filetes reestructurados contenían mayores cantidades de polifenoles solubles procedentes de las algas, responsables de la elevada estabilidad y actividad antioxidante durante el procesamiento y el almacenamiento (66,67). Estos resultados coinciden con otro estudio en el que los investigadores incluyeron dos carotenos procedentes de algas como la fucoxantina o astaxantina (68) y con otro, en el que la adición de extractos de algas mejoró la estabilidad del color y disminuyó la producción de LPO tras el almacenamiento y la cocción (69).

En relación con la funcionalidad, se han realizado estudios en animales de investigación para evaluar el efecto del consumo de carne enriquecida con algas sobre el estatus antioxidante (70-73). Así, durante un total de cinco semanas, diferentes grupos de ratas Wistar en crecimiento recibieron dietas (con o sin adición de factores hipocolesterolemiantes) cuya base era carne reestructurada de cerdo que contenía un 5% en peso de nori, wakame o espagueti de mar. Curiosamente, los efectos hipocolesterolemiantes de los cárnicos con algas respecto a los del cárnico control se tradujeron en una disminución de los niveles de antioxidantes. Así pues, el cárnico con wakame mostró mayor efecto antioxidante, pero poca acción hipocolesterolemiantes. Por su parte, el "espagueti de mar" se comportó como potente hipocolesterolemiantes, pero sus efectos antioxidantes potenciales se constataron solo parcialmente en nuestras condiciones experimentales. Estos resultados se explican, al menos parcialmente, porque la transformación de colesterol en ácido cólico requiere de la acción de la hemoenzima CYP7A1, la cual origina en presencia de hierro elevados niveles de ROS, lo que requiere de niveles elevados de antioxidantes, a fin de evitar el daño oxidativo y el bloqueo de la acción de esta enzima. Esta hipótesis se comprobó netamente en las ratas que consumieron el reestructurado de carne de cerdo con nori, ya que, respecto al cárnico control, tanto los efectos reductores de la colesterolemia, como los efectos antioxidantes fueron moderados. No obstante, y como resumen, debemos señalar que la acción hipocolesterolemiantes en las dietas que contenían algas fue significativa en el caso de incluir en los cárnicos nori o espagueti de mar, pero no wakame, lo que sugiere además que la acción reductora del colesterol plasmática, que se atribuye el arrastre de las sales biliares por la fibra de las algas, dependió claramente de la composición química de las mismas (60,62). Respecto a los efectos antioxidantes, aunque se observaron diferencias entre las tres cárnicos con algas, puede afirmarse, al menos parcialmente, que la carne enriquecida con algas ejerció efectos amortiguadores frente a la oxidación, ya que indujo una expresión moderada de enzimas antioxidantes [CAT, Mn-SOD, Zn-SOD y glutatión peroxidasa (GPx)] en ratas (70,72,73). Todas las algas analizadas contenían una cantidad considerable de xantófilas y compuestos polifenólicos, cuya actividad antioxidante puede ayudar a eliminar las ROS producidos



en la activación de la hemoenzima CYP7A1, haciendo innecesario aumentar la expresión de los mecanismos antioxidantes en el organismo (74). Asimismo, algunos péptidos bioactivos de las algas llamados ficobiliproteínas (complejos de proteínas y pigmentos) tienen actividades antioxidantes que pueden ser beneficiosas para reducir los efectos negativos de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo y a la inflamación (75).

Nuestro grupo ha revisado recientemente la importancia del consumo de algas en la prevención y tratamiento de la DMT2, incidiendo sobre los efectos de los diferentes polifenoles en la homeostasis de la glucosa (76). Resultados no publicados del grupo AFUSAN muestran que algunos extractos de algas comestibles (Sea spaghetti, Wakame, y Nori) presentaban un elevado efecto secretagogo GLP-1 *in vitro* en células STC1. Estos efectos difirieron dependiendo del alga y del tipo de extracto (acuoso, etanólico o clorofórmico). Por tanto, la inclusión en cárnicos de estos extractos, preferiblemente etanólicos y clorofórmicos del alga Nori, podría tener importancia clínica para pacientes con DMT2.

Respecto a la **inclusión de microalgas**, señalar que el grupo AFUSAN ha testado los efectos hipolipemiantes, antioxidantes, antiinflamatorios y antiobesidad de una carne funcional formulada con una mezcla de glucomanano más espirulina (*Spirulina platensis* o *Arthrospira maxima*) respecto a los de una carne funcional con glucomanano o de una carne control en ratas fa/fa alimentadas con dieta aterogénica (40,77) (Tabla 1). No obstante, debe señalarse que se trata de una cianobacteria, y no de un alga propiamente dicha, como sigue considerándose en ciertos círculos. En estas ratas genéticamente condicionadas, la inclusión de la dieta aterogénica indujo obesidad severa y elevó la colesterolemia a niveles muy críticos (próximos a 1000 mg/dL), con presencia de enormes concentraciones de lipoproteínas aterogénicas: lipoproteínas de muy baja densidad enriquecidas en colesterol o beta ( $\beta$ -VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL. La inclusión de glucomanano redujo la colesterolemia a valores del orden de 420 mg/dL con menor presencia de lipoproteínas aterogénicas, efecto que se potenció mucho más por la inclusión de glucomanano + espirulina, reduciéndose los valores de colesterol a niveles próximos a 240 mg/dL (77). La acción conjunta del glucomanano y espirulina redujo marcadamente la producción de ROS vinculada a la eliminación activa del colesterol en las ratas (78). Otros efectos notables fueron la reducción de los niveles de colesterol en hígado y plasma debido al incremento de la expresión génica de la enzima CYP7A1c y las modificaciones beneficiosas en la actividad de la enzima AE (78). A pesar de los efectos positivos de la espirulina en la actividad antioxidante y de la estabilidad que proporciona su incorporación a la carne, se necesitan más estudios para evaluar sus propiedades funcionales tanto en modelos animales como en humanos.

Debe insistirse que los efectos de las algas sobre la salud dependen en gran medida de su composición. También es importante señalar que los efectos de las algas utilizadas como ingrediente en alimentos potencialmente funcionales dependen de la matriz alimenticia en la que se incluyen. AFUSAN ha comparado tales efectos en matrices cárnicas y en matrices de concentrados de proteína de calamar sobre la colesterolemia, homeostasis de la glucosa y marcadores de inflamación en ratas Zucker fa/fa alimentadas con una dieta aterogénica (79,80). La inclusión de estos ingredientes funcionales en un producto de pescado hecho con proteína redujo los niveles en sangre de colesterol, glucosa, leptina y adiponectina; sin embargo, cuando se incluyó glucomanano más espirulina en una matriz de carne, no se observaron cambios en la glucemia.

Esta pérdida de efecto sobre la glucemia podría deberse al mayor contenido calórico de las dietas pertenecientes al estudio con carnes funcionales, pero también, entre otros aspectos, a la composición en ácidos grasos de las matrices alimentarias utilizadas.

### 7.3. Productos cárnicos funcionales con modificación del perfil de ácidos grasos. Enriquecimiento con ácidos grasos omega-3

Como ya comentábamos al inicio de este trabajo, en la población occidental se ha elevado el consumo de AGS y reducido el de AGP  $\omega$ -3 (2). Podemos señalar que en España, aproximadamente, alrededor del 25% de los lípidos consumidos deriva de carne y productos cárnicos (9,20). Por ello la modificación en los productos cárnicos del perfil de ácidos grasos puede ser una estrategia tecnológica correcta para reducir el consumo de AGS. Se basa en la sustitución parcial, total o casi total de la grasa cárnica, rica en AGS, por AGP y/o AGP  $\omega$ -3, para favorecer perfiles grasos en la dieta acordes a los objetivos nutricionales (2,9,18). Por ello, teniendo en cuenta los beneficios para la salud de los AGP  $\omega$ -3 (2,45), la industria alimentaria ha desarrollado estrategias para aumentar su concentración en los productos cárnicos mediante: a) la introducción de un aceite o alimento rico AGP  $\omega$ -3 (p. ej. aceite de lino, aceite de chia; nueces) (38,43,75,81) y b) la inclusión de acilglicerol en cuyos restos acilos se incluyan AGP  $\omega$ -3 [ácidos  $\alpha\omega$ -linolénico, dihomo-gamma-linolénico, eicosapentaenoico (EPA) y/o docosahexaenoico (DHA)] (44-46).

Teniendo en cuenta que la composición lipídica de la carne depende en gran medida de la composición grasa de los piensos consumidos por los animales destinados a producción y consumo, principalmente en los animales monogástricos, una de las estrategias más utilizadas es la incorporación de fuentes ricas en AGP  $\omega$ -3 (p. ej. aceites de pescado, colza o lino, chía, algas) en la alimentación animal. Este método es eficaz en la producción de carne de cerdo o de aves de corral (82, 83); sin embargo, los resul-



tados son contradictorios en el caso de la carne de vacuno o de cordero, debido a que los AGP de la dieta están sujetos a la biotransformación ruminal (84).

Aun así, aumentar la concentración de AGP en la carne podría ser una estrategia algo arriesgada, ya que estos ácidos grasos son los principales sustratos de los LPO (28). No obstante, el aumento de la oxidación por el enriquecimiento con AGP puede reducirse si los animales pastan, porque aumenta sus niveles de vitamina E (85). Además, la adición de AGP es especialmente problemática para los productos cárnicos, ya que las condiciones de procesamiento, como la molienda, la cocción y el secado, implican la exposición a temperaturas relativamente altas, la descomposición de los antioxidantes o el aumento de la oxidación del sustrato (86-89). Por ello, muchos estudios incluyen junto con AGP  $\omega$ -3 compuestos antioxidantes para garantizar su estabilidad desde su producción hasta el consumo (90,91).

El grupo AFUSAN ha comprobado en voluntarios con un riesgo elevado de ECV mediante un estudio secuencial, no aleatorizado y controlado de cinco meses de duración, el efecto del consumo de productos cárnicos (patés y salchichas) con un contenido reducido en grasa total, pero enriquecidos AGP  $\omega$ -3 ( $\alpha$ -linolénico, EPA y DHA) frente a productos cárnicos con bajo contenido graso y frente a productos cárnicos convencionales. Los voluntarios pasaron por tres periodos de un mes donde debieron consumir 200g/semana de salchichas y 250g/semana de patés de los tres tipos ya comentados. Entre los periodos de estudio estuvieron separado por "lavados" de un mes de duración (Tabla 1). Los efectos de la ingesta de los productos con bajo contenido total graso, pero elevado perfil de AGP  $\omega$ -3 frente a los productos cárnicos control se evaluaron mediante marcadores antropométricos y hormonales y mediante biomarcadores de ECV (37-39,44,45,84,92,93). Los resultados revelaron, entre otros aspectos, cambios en los niveles de LDLcolesterol (44), aumento de la actividad arilesterasa (AE) y una menor relación AE/oxLDL, lo que sugiere una mejora del estado antioxidante de las lipoproteínas tras el consumo de los productos cárnicos funcionales modificados conteniendo poca grasa total, pero con alta proporción en AGP  $\omega$ -3 (45). Quizás los efectos más relevantes se refieren a la reducción aproximadamente de un 70% de los niveles de tromboxano B2 en los voluntarios que tomaron los productos cárnicos enriquecidos en AGP  $\omega$ -3 respecto a los cárnicos convencionales (46).

El aceite de chia, obtenido de la semilla de la chía (*Salvia hispánica*, L.), es uno de los aceites con mayor contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico (81). El grupo AFUSAN ha estudiado en ratas Wistar envejecidas el efecto de dietas aterogénicas (ricas en colesterol y grasa saturada) en la que se incluyeron cárnicos reestructurados elaborados adicionando aceite de chia. Los efectos se compararon

frente a los de un grupo alimentado con la misma dieta aterogénica, pero con un cárnico enriquecido en hidroxitirosol o un cárnico control. Se determinó el perfil lipoproteico, la expresión de receptor para LDL, la composición de las lipoproteínas en colesterol triglicéridos, fosfolípidos y proteínas, el índice hepatosomático, el factor de transcripción nuclear E2 (Nrf2), y marcadores antioxidantes y de inflamación (Tabla 1). Los animales que recibieron el cárnico con aceite de chia presentaron niveles de colesterol en plasma e índice redox similares a los del grupo control que recibió una dieta rica en AGS, pero sin colesterol. El consumo del cárnico con chia redujo especialmente la presencia de  $\beta$ -VLDL (enriquecidas en colesterol y muy aterogénicas para la rata). Este efecto estuvo parcialmente relacionado con la expresión génica del factor de transcripción SREBP-1c que modula a su vez la actividad y expresión del receptor de LDL (43). A pesar del alto contenido de AGP  $\omega$ -3, el cárnico con aceite de chia redujo los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y demandó menos expresión de SOD, aunque la actividad de esta enzima antioxidante se mantuvo (81). El aceite de chia activó el Nrf2 para detener la respuesta prooxidante inducida por la eliminación de colesterol vía ácido cólico y por el propio envejecimiento. El sistema de la óxido nítrico-sintasa endotelial (eNOS) fue menor en el grupo que ingirió cárnico con hidroxitirosol que en el que recibió el cárnico formulado con aceite de chia, lo que sugiere su actividad antiaterogénica y el efecto protector relacionado contra la ingesta elevada de AGP. El aumento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) fue bloqueado parcialmente en el grupo que ingirió cárnico con aceite de chia (81). Los resultados indican que este aceite tiene la capacidad de prevenir el daño oxidativo y modificar la respuesta inflamatoria, lo que apunta una regulación adecuada del sistema antioxidante y subraya la importancia de incorporar AGP  $\omega$ -3 en la dieta y particularmente cuando se trate de dieta con alto contenido de AGS y colesterol (43,81).

A pesar de los resultados prometedores asociados al consumo de AGP  $\omega$ -3, existen pocos productos cárnicos industriales enriquecidos con dichos ácidos grasos. La dificultad tecnológica para garantizar su estabilidad puede ser una de las causas, lo que representa una interesante línea de investigación y desarrollo de productos para mejorar la salud de los consumidores (15).

#### 7.4. Productos cárnicos funcionales con inclusión de silicio en derivados cárnicos

El silicio es un oligoelemento esencial para el crecimiento y la función biológica de varios microorganismos, plantas y animales (93,94). Aunque se han publicado resultados que sugieren beneficios del silicio en la salud (95,96), hasta la fecha no se han definido las ingestas dietéticas de referencia de este mineral. Los estudios *in vitro* han demostrado que el silicio eleva la actividad antioxidante en diferentes tipos de células (97).

#### Healthy and functional meat products.

##### Scientific evidence of the AFUSAN group

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 603-626



La inclusión de silicio en la carne reestructurada aseguraría, por un lado, la ingesta adecuada de este micronutriente esencial y, por otra, permitiría beneficiarse de sus propiedades nutricionales y funcionales al consumirla como ingrediente de los cárnicos, reduciendo los posibles efectos negativos atribuidos al alto consumo de estos alimentos (98). Aunque no existen datos publicados sobre la estabilidad oxidativa de los cárnicos enriquecidos con silicio durante el almacenamiento, la cocción y la digestión, datos preliminares de AFUSAN, utilizando un modelo *in vitro* de sistema digestivo, sugieren que la carne de cerdo enriquecida con silicio sufre menos oxidación que su control sin silicio.

En cuanto a sus propiedades funcionales y de salud, hay que señalar que la administración de silicio, mediante *gavage* esofágico a ratas Wistar jóvenes sanas, fue capaz de reducir la digestión y absorción de glucosa y aceite de oliva. Los efectos sobre las curvas postprandiales de glucemia y trigliceridemia fueron observables desde las primeras dosis, pero particularmente relevantes después de una semana de administrar diariamente silicio (99).

Considerando estas premisas se plantearon una serie de estudios en los que se evaluó la funcionalidad de cárnicos a los que se incorporó silicio inorgánico. Estos estudios se hicieron en ratas de 60 semanas de forma similar a lo comentado para el aceite de

chia e hidroxitirosol (Tabla 1). Los resultados señalan una excreción fecal total y de grasa elevada en los animales que recibieron cárnico enriquecido en silicio respecto al cárnico control. Se observó una reducción de la expresión del transportador para glucosa SLGT1 tanto en duodeno como en yeyuno. A nivel de lipoproteínas se observaron mejoras significativas en los animales alimentados con carne enriquecida con silicio en el marco de una dieta aterogénica (41) ya que redujo la colesterolemia, la trigliceridemia, la concentración de  $\beta$ -VLDL, la peroxidación de las VLDL e incrementó la cantidad de receptor hepático para LDL (41). Uno de los resultados más espectaculares fue la reducción de la esteatosis hepática, así como de la inflamación periportal que originó la dieta rica en AGS y colesterol (100) (Figura 4).

Asimismo, se observó una mejora en los niveles de los antioxidantes hepáticos, especialmente para la SOD, a través de la activación del factor Nrf2 en ratas que desarrollaron la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y que estuvieron alimentadas con carne enriquecida con silicio. También se observó reducción de la apoptosis (del factor inductor de apoptosis y de factores proapoptóticos vs antiapoptóticos), así como de la presencia de células inflamatorias a nivel hepático (100).

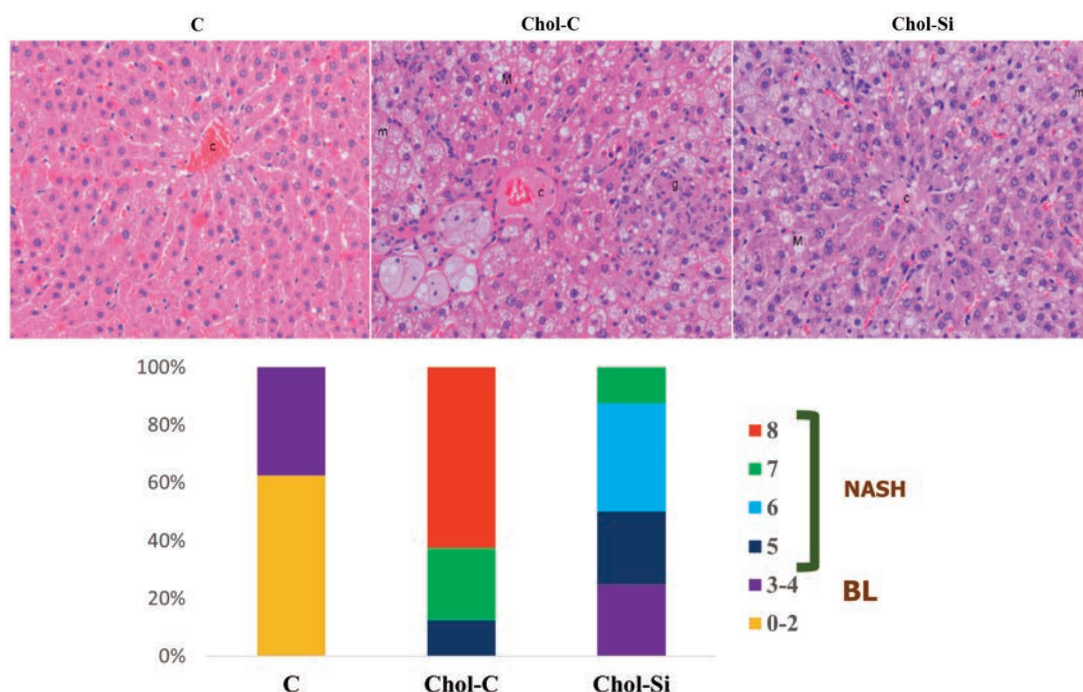


Figura 4. A) Cambios a nivel histológico hepático de ratas Wistar de 60 semanas que recibieron reestructurados cárnicos en la dieta. C, grupo control que recibió dieta rica en ácidos grasos saturados (AGS); Chol-C, grupo control hipercolesterolemia que recibió una dieta aterogénica rica en AGS y colesterol y el cárnico control; Chol-Si, grupo hipercolesterolemia-silicio, que recibió una dieta aterogénica rica en AGS y colesterol y el cárnico enriquecido en silicio. Obsérvese la balonización y esteatosis e infiltración leucocitaria en el grupo Chol-C. Tales alteraciones fueron mucho menos evidentes en el grupo Chol-Si. Tinción Hematoxilina-Eosina. B) Esteatosis no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en las ratas de los tres grupos estudiados, considerando la puntuación NAS. Ninguna rata del grupo C, fue diagnosticada de (NASH), mientras que el 100% de las ratas del grupo C mostró NASH. En las ratas del grupo Chol-Si, la prevalencia de NASH fue del 75%. Adaptado de Garcimartín y col. (100).



Estos datos indican que el consumo de la carne funcional con silicio respecto a la carne convencional en el marco de una dieta aterogénica enriquecida en colesterol, bloquea el paso NAFLD a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), ya que logra reducir significativamente el porcentaje de ratas diagnosticadas de NASH definitivo. La mejora en el estado antioxidante parece ser parcialmente responsable de la reducción de la apoptosis hepática encontrada en estos animales, lo que sugiere el papel hepatoprotector inducido por el silicio incorporado en un modelo animal de NAFLD (100).

Muy recientemente el grupo AFUSAN ha estudiado la influencia de la incorporación de cárnicos enriquecidos en silicio a dietas aterogénicas ricas en AGS y colesterol a animales a los que se había inducido un estado avanzado de DMT2 mediante la inyección de estreptozotocina + NAD en la absorción de colesterol y los mecanismos fisiológicos subyacentes (101). Los resultados a nivel duodenal son relevantes y novedosos, ya que existen muy poca evidencia científica en modelos de DMT2 y sugieren que el consumo una matriz cárnica enriquecida en silicio frente a una matriz cárnica control mejora la colesterolemia y los niveles de lipoproteínas aterogénicas a través de 1) reducir la absorción incrementada de colesterol en las ratas diabéticas que consumen el cárnico control por disminuir el área de absorción y los niveles de ACAT2 y 2) incrementar la excreción de colesterol por inducción de LXR y los transportadores ABCG5/G8.

### 7.5. Productos cárnicos con adición de fibra dietética, asociada a extractos vegetales o a proantocianidinas de la pulpa de algarroba

Como es evidente, la carne carece de fibra dietética (102, 103). Su incorporación en la formulación de carnes funcionales ha sido ampliamente estudiada, ya que le aporta notables propiedades tecnológicas (retención de agua, lubricación, capacidad de disminuir las pérdidas por cocción, estabilización del producto, modificación de la textura y sabor neutro) y nutricionales (fuente de alto contenido en fibra y componentes asociados como polifenoles, diversificación de la microbiota intestinal y efectos hipocolesterolemiantes, antioxidantes y/o saciantes) (104). Además, muchos compuestos antioxidantes, como los polifenoles y los carotenoides, se consideran asociados y en cierto modo inseparables de la fibra dietética (103, 105, 106). Aunque existen muchos tipos de biofenoles, su estructura fenólica los convierte en eficaces donantes de electrones o hidrógeno para neutralizar los ROS y las especies reactivas del nitrógeno (RNS) (15,103,107). Se ha informado que los polifenoles presentan diferentes propiedades al respecto: (a) interrumpen la etapa de propagación de las reacciones en cadena de autooxidación de los lípidos al ser eficaces captadores de "radicales libres" (108); (b) actúan como quelantes de metales oxidantes con la consiguiente disminu-

ción de los -OH reactivos causados por la reacción de Fenton (108); y (c) activan, en forma libre o glicosilada, la vía antioxidante promoviendo la translocación de Nrf2 al núcleo, activando el elemento de respuesta antioxidante (109). Estas propiedades sugieren la conveniencia de diseñar productos cárnicos enriquecidos con compuestos antioxidantes asociados a la fibra.

Otro aspecto importante se refiere a mantener las condiciones óptimas y la estabilidad de la carne durante el almacenamiento y la cocción (28,103,110). El enriquecimiento de los productos cárnicos con diferentes extractos de frutas reduce su alteración oxidativa durante la cocción y posterior refrigeración (111) (figura 3). Además, la disminución de la producción de carbonilos en la carne se relaciona con una alta concentración de flavonoides, que bloquea la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de lisina, prolina, arginina e histidina (15) (figura 3).

La adición de concentrados de fibra y proantocianidinas a sistemas cárnicos, equivalentes a los que se utilizan en la preparación de salchichas, alargó de forma significativa la vida útil de estos productos en refrigeración y congelación cuantificada por la presencia de productos de oxidación como TBARS y de compuestos de alteración lipídica, en particular en el caso de añadir un producto enriquecido en taninos condensados no extraíbles (112).

Varios estudios *in vivo* han evaluado los efectos de los extractos vegetales añadidos a los productos cárnicos enriquecidos, teniendo en cuenta tanto sus propiedades tecnológicas como su estabilidad oxidativa (15). Entre los resultados merecen destacarse los obtenidos en un modelo animal de cáncer colorrectal en el que se testó el consumo de carne de cerdo curada enriquecida con vino tinto (2%), granada (0,6%) y  $\alpha$ -tocoferol (0,045%) y se observó una reducción tanto del contenido de LPO en heces como la formación de ácido mercaptúrico 1,4-dihidroxinonano en orina (el principal metabolito urinario del 4HNE y un indicador de la LPO) (113). También hay que señalar que en otro estudio se evaluó el efecto protector de las antocianinas frente al cáncer colorrectal. Así, el consumo de salchichas enriquecidas con antocianinas (0,11%) aumentó la actividad antioxidante total del plasma y redujo la abundancia de bacterias proinflamatorias (114).

Desde tiempo inmemorial, la pulpa de la vaina del algarrobo (*Ceratonia siliqua*, L.) de la familia de las Fabaceas, se ha utilizado con diferentes fines gastronómicos, en particular para repostería. Esta pulpa tiene un alto contenido en azúcar, fibra, minerales y polifenoles (fundamentalmente proantocianidinas), mientras que las semillas son más ricas en grasas y pobres en azúcares que la pulpa y de ellas se obtiene un producto muy apreciado el "garrofín" que se emplea de forma asidua por la industria alimentaria y farmacéutica (115). A partir de la pulpa se han obtenido diferentes extractos, mostrándose la composición de dos de ellos en la figura 5.



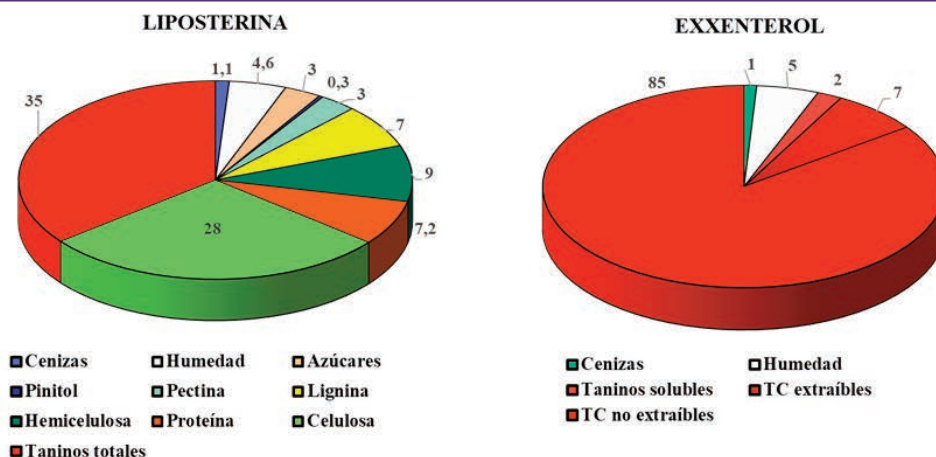


Figura 5. Composición de dos extractos de pulpa de algarrobo, Exxenterol y Liposterina. Se diferencian fundamentalmente en su concentración en taninos, integrados por la unión de moléculas de proantocianidinas. Para facilitar su identificación, la proporción de los taninos constituyentes de ambas fracciones se han coloreado en diferentes gamas del color rojo. TC, taninos condensados. Adaptado de Bastida y col. (112).

El grupo AFUSAN, antes de analizar las propiedades funcionales de los extractos de algarrobo y su aplicación en patologías clínicas, comprobó que estos extractos eran capaces de reducir de forma dosis-dependiente la curva postprandial de glucemia y la de triglicéridos en ratas jóvenes, lo que le convertía en un candidato para estudiar estos efectos en un modelo de DMT2 en roedores (116, 117) (Figura 6).

Posteriormente el grupo AFUSAN ha evaluado el efecto de una carne enriquecida con extracto de algarroba (0,4g/100g de carne) durante ocho semanas en dos modelos animales de DMT2 (Tabla 1). En la fase inicial de la DMT2, el consumo de carne funcional redujo la hiperinsulinemia y corrigió parcialmente la dislipemia, afectando parcialmente a la concentración de las VLDL, y por tanto a la trigliceridemia, como consecuencia de una mejora en la señalización de la insulina a nivel hepático con incremento de

los niveles de PI3K, pAKT y mejora del transportador de glucosa GLUT2 (47). También debe resaltarse que la carne con el extracto de algarrobo aumentó la actividad de la AE, una de las tres actividades de la enzima PON1 en el hígado, pero redujo la actividad en el plasma (47). La PON1 se define como una enzima sucida, que ejerce efectos antioxidantes pleiotrópicos y protege, en condiciones de alto estrés oxidativo con ausencia de antioxidantes, de la oxidación a muchas macromoléculas (p. ej. lipoproteínas plasmáticas) (118). Además, resultados aún no publicados señalan que la carne con el extracto de algarrobo moduló parcialmente en la fase inicial de la DMT2 la composición de la microbiota intestinal, manteniendo unos niveles más elevados de bacterias del grupo *Clostridium leptum* y de la especie *Faecalibacterium prausnitzii*, al mismo tiempo que redujo los niveles de bacterias potencialmente menos beneficiosas como *Enterobacteriaceae*. Todo ello, resultó en un incremento en el

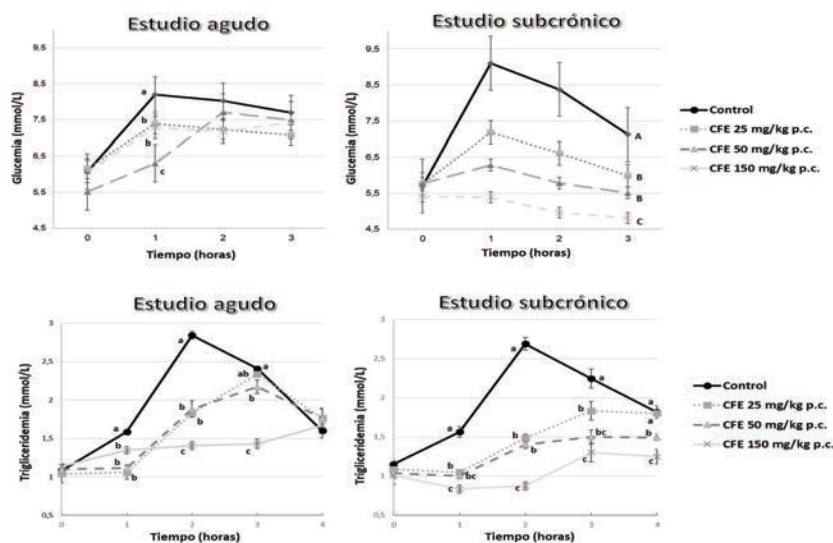


Figura 6. Cambios postprandiales de la glucemia y trigliceridemia en ratas sanas jóvenes tras el aporte agudo (primer día) o subcrónico (al quinto día) de aceite de oliva y glucosa y cantidades crecientes de extracto de algarrobo rico en proantocianidinas CFE. Adaptado de Macho y col. (116, 117).

contenido de butirato en heces y a reforzar la barrera colónica (48). De hecho, las proantocianidinas son metabolizadas por la microbiota, liberando grandes cantidades de metabolitos antioxidantes en el plasma (119). Esto sugiere que la carne enriquecida con extracto rico en proantocianidinas puede reducir el estrés oxidativo en la fase inicial de la DMT2, ya que no se requiere una actividad plasmática adicional de AE (47).

Para el estudio de las acciones de este extracto en la fase tardía de la DMT2, se indujo la lesión pancreática mediante inyección de estreptozotocina más ácido nicotínico (STZ + NAD). El NAD, actuó como protector evitando que las células beta-pancreáticas perdieran totalmente la capacidad de producir insulina. Junto al grupo que recibió una dieta aterogénica incluyendo carne control, se incluyeron dos grupos en los que se ensayó la carne enriquecida en extracto de algarrobo. Uno de ellos se utilizó como grupo de prevención, el cual recibió el cárnico enriquecido en extracto de algarrobo desde el inicio del estudio, y el otro como grupo de tratamiento, en el que se incluyó el cárnico funcional una vez establecida la DMT2 por la inyección de STZ + NAD (Tabla 1). Al igual que en el modelo inicial, tanto el grupo de prevención como de tratamiento, corrigieron parcialmente la dislipemia diabética con disminuciones en la oxidación de las VLDL, lipoproteína mayoritaria en la rata (120) y mejoraron notablemente la señalización de insulina a nivel hepático, incrementando los niveles y expresión de las principales proteínas implicadas en la transducción de señales (ruta InsR/PI3K/AKT/GSK3) (121). Además, en ambos casos se observó una mejoría relevante y significativa en la glucemia, una

mejor salud pancreática, con presencia de islotes de Langerhans regulares (área de células- $\beta$  productoras de insulina), mayor concentración de insulina y una mayor proliferación celular en comparación con el grupo control (121) (Figura 7).

También se procedió a evaluar el efecto del consumo del cárnico enriquecido en el extracto de algarrobo sobre la NAFLD, principal manifestación hepática de la DMT2. De forma muy similar a lo anteriormente comentado, tanto la prevención como el tratamiento con el extracto de algarrobo, redujeron la acumulación de lípidos hepáticos, aspecto que principalmente se relacionó con una menor absorción de los lípidos de la dieta, una mejora de la señalización de la insulina y una reducción de los factores de transcripción lipogénicos (121).

Por último, estudiamos el efecto de este cárnico funcional conteniendo el extracto de algarrobo rico en proantocianidinas sobre la microbiota intestinal y la salud colónica. De forma preventiva bloqueó parcialmente la disbiosis de la microbiota intestinal inducida por una dieta alta en grasas saturadas y colesterol, observándose niveles superiores en el grupo de prevención que en el control diabético de *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus spp.*, especies claramente beneficiosas. Este equilibrio de la microbiota intestinal, mantuvo una producción adecuada de ácidos grasos de cadena corta, especialmente de acetato, propionato y butirato, lo que redujo parcialmente las alteraciones colónicas inducidas por la dieta rica en AGS y colesterol, consiguiendo una adecuada estructura de las células del intestino grueso y, por tanto, una mejor salud colónica. No obstante, cuando el cár-

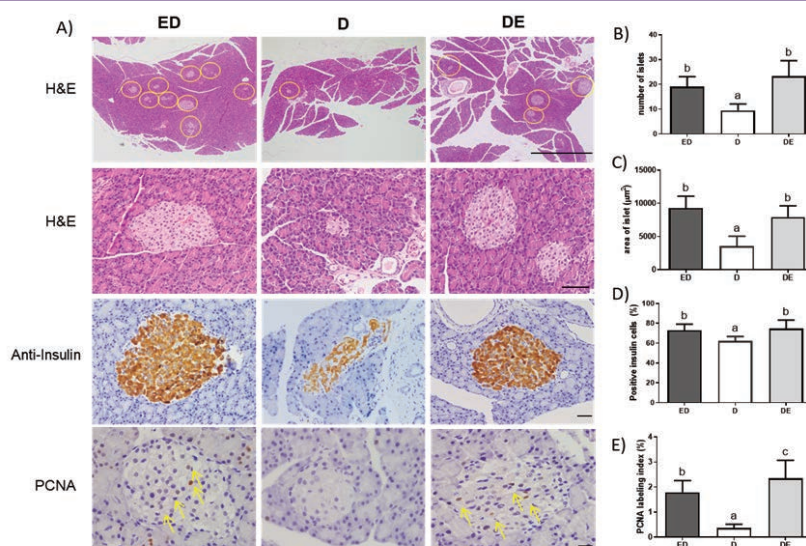


Figura 7. Cambios a nivel pancreático de ratas Wistar diagnosticadas de DMT2 en estadio tardío, acorde a sus niveles de glucosa e insulina, que recibieron reestructurados cárnicos en la dieta conteniendo o no extracto de algarrobo. D, grupo control diabético que recibió dieta rica en AGS más colesterol, más cárnico control e inducción de diabetes con streptozotocina + NAD; ED, grupo de prevención que consumió dieta rica en AGS más colesterol más cárnico enriquecido en el extracto de algarrobo durante todo el estudio (desde antes de la inducción de diabetes con streptozotocina + NAD); DE grupo de tratamiento que consumió dieta rica en AGS más colesterol más cárnico enriquecido en el extracto de algarrobo a partir de la inducción de diabetes con streptozotocina + NAD). Se observa en los grupos ED y DE mejoría de la funcionalidad insular atendiendo a los incrementos tanto del número, como del tamaño de los islotes, de la producción de insulina y del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). AGS, ácidos grasos saturados; NAD, nicotinamida. Adaptado de Macho-González (121).



nico funcional enriquecido con el extracto de la pulpa de algarrobo se introdujo una vez instaurada la patología diabética, no consiguió revertir la microbiota intestinal en su totalidad, pero reforzó notablemente la barrera intestinal, mostrando niveles más elevados de ocludina y reducidos de zonulina-1 (48) (Tabla 1).

Estos estudios confirman que la inclusión del extracto rico en proantocianidinas como ingrediente funcional en un reestructurado cárnico parece ser una estrategia nutricional adecuada para pacientes con prediabetes y DMT2 con el objetivo de mejorar o ralentizar la evolución de dicha patología.

En la actualidad, AFUSAN está testado en modelos murinos de DMT2 los posibles beneficios de la sustitución en la dieta de un cárnico control por otro enriquecido en extracto de pulpa de algarrobo sobre la señalización de insulina y protección antioxidante a nivel cerebral, siendo los resultados preliminares obtenidos muy prometedores.

## 8. CÁRNICOS FUNCIONALES Y DIETA DE PRECISIÓN

El efecto de cualquier alimento funcional debe considerarse en función de las características fenotípicas del consumidor en el que su genoma y el entorno están en continuo diálogo (122-124). Por ello, parece necesario, a fin de incrementar la eficacia de la dietoterapia, el diseño de una nutrición de precisión que determine con exactitud el efecto de la dieta global, de nutrientes y compuestos bioactivos en la expresión de los genes y sus consecuencias sobre la síntesis proteica (proteómica), el metabolismo (metabolómica) y la diversidad génica de la microbiota (metagenómica) (125).

La nutrigenómica se definió inicialmente como el estudio de los efectos de los nutrientes/alimentos en la expresión génica de un individuo. Posteriormente, este concepto se ha ampliado para abarcar los factores nutricionales que protegen el genoma de posibles daños (126). Además, los alimentos y sus componentes pueden provocar modificaciones epigenéticas en la transcripción del ADN y la traducción del ARNm, contribuyendo a mejorar o empeorar los aspectos fisiopatológicos de una enfermedad, lo que refuerza la importancia de realizar estudios de intervención nutricional adecuados (122,124,125). Sin embargo, las interacciones entre dieta y genes son complejas y difíciles de predecir, lo que ha dado lugar a un gran número de estudios basados en estudios de asociación del genoma completo (GWAS), aplicaciones de puntuaciones (scores) de riesgo genético (GRS) y técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) (122-124). Asimismo, los análisis de secuenciación del ARNm, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica, la lipidómica y los estudios de asociación de todo el epigenoma (EWAS) también contribuirán a conseguir que se realice una nutrición de precisión (122,124-126).

Nuestro grupo ha informado de que las respuestas antioxidantes en voluntarios con alto riesgo de ECV que consumen carne enriquecida con pasta de nuez varían según dos formas polimórficas principales de las variantes Q192R (rs662) y L55M (rs854560) del gen *PON1* (127, 128). Aunque el tamaño muestral era limitado, los resultados obtenidos sugieren que los cambios en los marcadores del estado antioxidante de los voluntarios tras el consumo de carne enriquecida con nueces tras un periodo de cinco semanas fueron mayores en los portadores de PON1 QQ que en los de PON1 QR + RR. Además, el polimorfismo PON1 Q192R estaba más relacionado con el estado antioxidante que el PON1 L55M (127). También comprobamos los efectos de cárnicos enriquecidos en pasta de nuez en individuos con riesgo cardiovascular elevado que eran portadores del Alelos PON-1 y ApoA4 360 sobre la concentración de moléculas de adhesión sICAM y sVCAM y de leucotrieno B4 (LTB4) (58). Los resultados sugieren la necesidad de genotipar a la población dada la diferente respuesta observada en unos portadores respecto a otros.

Por otra parte, los nutrientes y los compuestos bioactivos ejercen sus efectos sobre la salud a través de mecanismos nutrigenómicos y epigenómicos (122-125). En las secciones anteriores hemos comentado cómo el consumo de extractos de plantas, algas, silicio, etc., afecta a las expresiones génicas de las enzimas antioxidantes, modificando así el estado antioxidante de los consumidores. La importancia de la transcriptómica y de otras tecnologías "ómicas" en la nutrición de precisión parece evidente, ya que varios polimorfismos de genes implicados en vías metabólicas se han relacionado con enfermedades degenerativas (129). Los efectos negativos del alto consumo de carne en la celularidad del colon parecen estar estrechamente relacionados con la naturaleza y la presencia de un microbioma rico en bacterias proteolíticas. No obstante, el consumo conjunto de carne y de hidratos de carbono digeribles permite amortiguar estos efectos negativos (130), ya que una dieta rica en hidratos de carbono hace que predominen las bacterias sacarolíticas del colon. Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de consumir una dieta plural o incluir algunos compuestos vegetales fermentables cuando se consuman con frecuencia alimentos ricos en proteínas de origen animal como la carne.

A pesar de estos retos, los productos cárnicos funcionales formulados con ingredientes antioxidantes no sólo deberían reducir la formación de ROS y otros compuestos de oxidación, sino también potenciar las vías antioxidantes mediante la modulación de los niveles de varios factores de transcripción [p. ej. Nfr2, NF-κB, el receptor X de retinoides (RXR) y el receptor de vitamina D (VDR)]. Estos efectos parecen estar mediados por cambios epigenéticos asociados a su consumo, lo que indica que son un arma nutricional potencial para ayudar a mejorar las patologías crónicas, y más teniendo en cuenta la posible adición a los cárnicos de algunas vitaminas liposolubles (p.ej., vitamina D) debido a sus efectos antioxidantes y antitumorales (131).





## 9. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

El grupo AFUSAN en colaboración con investigadores del ICTAN ha diseñado y desarrollado una gran cantidad de posibles alimentos funcionales con base de carne para cubrir dos objetivos principales: mejorar la composición y la vida útil de los productos cárnicos y mejorar el estado de salud de los consumidores mejorando una o más funciones corporales y/o reduciendo el riesgo de desarrollo de enfermedades degenerativas.

Los productos cárnicos modificados garantizan atributos de calidad aceptables en términos de propiedades fisicoquímicas y sensoriales, así como de estabilidad.

La alimentación animal y la formulación de alimentos son las dos formas más habituales de obtener alimentos saludables y funcionales.

La carne y los productos cárnicos se han convertido en matrices alimentarias ideales para suministrar compuestos bioactivos (p. ej. fibra, AGP  $\omega$ -3 y péptidos bioactivos) o alimentos completos (p. ej. nueces y algas) sin cambiar los hábitos alimentarios, lo que contribuye a mejorar la calidad y la adecuación nutricional de la dieta.

La información sobre la protección contra la oxidación de la carne con ingredientes funcionales es amplia, pero son pocos los estudios que han evaluado los efectos saludables y protectores *in vivo* de la carne funcional tras su consumo.

El consumo habitual de productos cárnicos adecuadamente formulados garantiza una mejora del perfil lipoproteico y por tanto del riesgo cardiovascular y del estado antioxidante, ya que reduce los niveles de algunos marcadores específicos de oxidación (TBARS, MDA) y mejora el sistema de glutatión, reduciendo sus consecuencias metabólicas negativas (alteración del ADN, producción de interleucinas, apoptosis celular, etc.).

Dada la escasez de estudios y resultados, es urgente investigar de qué forma los distintos sistemas de cocinado (cocción, calentamiento, hervido, fritura, etc.) afectan a la biodisponibilidad del ingrediente funcional y a su funcionalidad.

Se necesitan trabajos futuros no sólo para evaluar los efectos sobre la salud mediados por los productos cárnicos funcionales, sino también para orientar a las personas que se ven más afectadas por su consumo.

Deben estudiarse los efectos plurales o "multitarjet" (antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos, etc.) del consumo de cárnicos funcionales en órganos mitóticos y no-mitóticos de animales jóvenes y viejos, machos y hembras, en el marco de diferentes dietas y estados fisiológicos y nutricionales.

Es urgente la realización de estudios controlados a largo plazo para comprender cómo los efectos de las carnes funcionales se ven afectados por las mediciones "ómicas".

## Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente subvencionado los Proyectos PID2019-103872RB-I00. PID2019-103872RB-I00 y /AEI/10.13039/501 100 011 033. Rocío Redondo-Castillejo es beneficiaria de una beca FPU20/0 2920 del Ministerio de Universidades y Adrián Macho-González beneficiario de una beca postdoctoral Margarita Salas en el Albert Einstein College of Medicine de Nueva York.

## Abreviaturas

ABCG, transportador ATP binding cassette tipo G; ACAT, transferasa de restos ácidos al colesterol en hígado; ADA, American Dietetic Association; ARN, ácido ribonucleico; AE, arilesterasa; AFUSAN, Alimentación Funcional, Salud y Nutrición; AGP, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; pAKT, proteína cinasa B fosforilada; ARN, ácido ribonucleico; CAT, catalasa; COX, ciclooxigenasa; CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; CYP7A1, isoforma 7A1 del citocromo P450; DHA, ácido docosahexaenoico; DMT2, diabetes mellitus tipo 2; ECV, enfermedades cardiovasculares; eNOS, óxido nítrico-sintasa endotelial; EPA, ácido eicosapentaenoico; EWAS, estudios de asociación de todo el genoma; FDA, Federal Drug Administration; FOSHU, Foods for Specific Health Use o alimento de uso específico para la salud; FUFOS, Functional Food Science Europe; GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1; GLUT2, transportador 2 de glucosa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GRS, puntuación o score de riesgo genético; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GWAS, estudios de asociación del genoma completo; HDL, lipoproteínas de alta densidad; HNE, hidroxinonenal; ILSI, International Life Science Institute; ICTAN, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LPO, lipoperóxidos; LTB, leucotrieno de la serie B; LXR, factor de transcripción receptor hepático; MDA, malondialdehído; NAD, Nicotinamida; NAFLD, enfermedad del hígado graso no alcohólico; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; NGS, técnicas de secuenciación de nueva generación; Nrf2, factor de transcripción nuclear E2; NF-kB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; OMS, Organización Mundial de la Salud; OVN, Optimum Vitamin Nutrition o Nutrición Óptima de Vitaminas; PI3K, Fosfatidilinositol kinasa; PON, paraoxonasa; RDA, recommended dietary allowances o ingestas dietéticas recomendadas; ROS, especies reactivas del oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno; RXR, receptor X de retinoides; sICAM, molécula soluble de adhesión intercelular; SOD, superóxido dismutasa; SREBP, sterol regulatory element-binding protein o proteína de unión al elemento receptor de esteroides; STZ, estreptozotocina; sVCAM, molécula soluble de adhesión vascular; TBARS,

sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa; UCM, Universidad Complutense de Madrid; VDR, receptor de vitamina D; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

## 10. REFERENCIAS

1. Sánchez-Muniz FJ. Obesidad un componente clave del síndrome metabólico. En: Sánchez-Muniz FJ. (Ed. y director) y Bastida Codina S, Gesteiro Alejos E, Garcimartín Álvarez A (Coed.). IV y V Cursos Avanzados sobre Obesidad y Síndrome Metabólico. Monografía XLVI. Madrid: Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. 2018; pp.17-44.
2. Sánchez-Muniz FJ, Bastida S. Lípidos. En: Varela G. (coord.). Libro Blanco de la Nutrición en España. Madrid: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y Fundación Española de la Nutrición (FEN) 2013; pp. 113-24.
3. Palmeros Exsome C, Hurtado Capetillo JM, Torres Flores B. La obesidad en México. Programas en marcha. An Real Acad Farm 2016; 82(Special Issue): 55-63.
4. Escobar Toledo D, Calonge Pascual S, González-Gross M. Gasto energético: algo más que balance. En: Sánchez-Muniz FJ. (Ed. y director) y Bastida Codina S, Gesteiro Alejos E, Garcimartín Álvarez A (Coed.). IV y V Cursos Avanzados sobre Obesidad y Síndrome Metabólico. Monografía XLVI. Madrid: Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. 2018, pp. 65-86.
5. OMS <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
6. Del Pozo de la Calle S, Alonso Ledesma I, Nuñez O, Castelló Pastor A, Lope Carvajal V, Fernández de Larrea Baz N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Ruiz Moreno E. Composition and nutritional quality of the diet in Spanish households during the first wave of the COVID-19 pandemic. Nutrients 2021; 13: 1443.
7. Ruiz-Roso MB, Knott-Torcal C, Matilla-Escalante DC, Garcimartín A, Sampedro-Nuñez MA, Dávalos A, Marazuela M. COVID-19 lockdown and changes of the dietary pattern and physical activity habits in a cohort of patients with type 2 Diabetes Mellitus. Nutrients 2020; 12: 2327.
8. Weng W, Chen J. The Eastern perspective of functional foods based on traditional Chinese Medicine Nutr Rev. 1996; 54: S11-6.
9. Sánchez-Muniz FJ. La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales. En: Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B (eds.). La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales. Madrid: Fundación Española de la Nutrición (FEN), 2004; pp. 39-58.
10. Celada-Rodríguez P, Sánchez-Muniz FJ. Alimentos funcionales, rendimiento físico y deporte. En: González-Gross M. (directora). Aparicio-Ugarriza R, Fuentes Jimenez F, Mielgo-Ayuso JF (codir.). Nutrición deportiva. Desde la fisiología a la práctica. Buenos Aires: Ed. Panamericana 2020; pp. 381-404.
11. Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. Scientific concepts of functional food in Europe: Consensus document. Br J Nutr. 1999; 81 (Suppl. 1): S1-27.
12. Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea 18.1.2007; L 12/3.
13. FDA FSHN12-17/FS210 Functional Foods. Publicaciones del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición Humana, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida (UF/IFAS). Fecha de primera publicación: December 2012. Revisado July 2016 and March 2020. <https://edis.ifas.ufl.edu>
14. Aranceta Bartrina J. ¿Es necesario incluir alimentos funcionales en nuestra alimentación? Revista de Nutrición Práctica 1999; 3: 49-58.
15. Macho-González A, Bastida S, Garcimartín A, López-Oliva ME, González P, Benedi J, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Functional meat-products as oxidative stress modulators: a review. Adv Nutr 2021; 12(4): 1514-39.
16. <https://thefoodtech.com/tendencias-de-consumo/consumo-carnico-a-nivel-mundial/#>
17. Godfray HCJ, Aveyard P, Garnett T, Hall JW, Key TJ, Lorimer J, Pierehumbertr RT, Scarborough P, Springmann M, Jebb SA. Meat consumption, health, and the environment. Science 2018; 361(6399): 5324.
18. Olmedilla-Alonso B, Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. Meat Sci; 2013; 95: 919-30.
19. FAO F. a. A. O. o. t. U. N. FAOSTAT. 2016. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>
20. Sánchez-Muniz FJ en representación del grupo AFUSAN. Nuevas recomendaciones sobre el consumo de carne. XIII Congreso Internacional sobre Dieta Mediterránea. Fundación Mediterránea. Barcelona 6-7 de abril, 2022.
21. Comisión Europea. Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea 2006; 139:55
22. Celada P, Sánchez-Muniz FJ. Are meat and meat product consumptions harmful? Their relationship with the risk of colorectal cancer and other degenerative diseases. An Real Acad Farm 2016; 82(1): 68-90.





23. Bello Gutiérrez J. Carne y derivados. En: Astiasarán I, Martínez JA (Direc.). Alimentos. Composición y propiedades. Madrid: McGraw-Hill Interamericana 2000, pp. 11-28.
24. Celada P, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. To eat or not to eat meat. That is the question. *Nutr Hosp* 2016; 33(1): 177-81.
25. Song P, Wu L, Guan W. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: A Meta-analysis. *Nutrients*. 2015; 7(12): 9872-95.
26. Aune D. Plant Foods, antioxidant biomarkers, and the risk of cardiovascular disease, cancer, and mortality: a review of the evidence. *Adv Nutr* 2019; 10(Suppl. 4): s404-21.
27. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757-72.
28. Macho-González A, Garcimartín A, López-Oliva ME, Benedí J, Bastida S, Ros G, Nieto G, Sánchez-Muniz FJ. Can meat and meat-products induce oxidative stress? *Antioxidants* 2020; 9(7): E638.
29. Corpet DE. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science* 2011; 89: 310-6.
30. Hill AB. The environment and disease, Association: or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1965; 58: 295-300.
31. Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V. Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2017; 16(1): 96-123.
32. Olivero David R, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Benedí J, González-Muñoz MJ. Gastric emptying and short-term digestibility of thermally oxidized sunflower oil used for frying in fasted and nonfasted rats. *J Agric Food Chem* 2010; 58(16): 9242-8.
33. Kanner J, Gorelik S, Roman S, Kohen R. Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low-density lipoprotein modification: the stomach as a bioreactor. *J Agric Food Chem* 2012; 60(36): 8790-6.
34. Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *J Agric Food Chem* 2005; 53(9): 3397-3402.
35. Garcimartín A, Macho-González A, Caso G, Benedí J, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Frying a cultural way of cooking in the Mediterranean diet and how to obtain improved fried foods. En: Preedy V, Watson R. (eds.). *The Mediterranean Diet*. London, UK: Academic Press, 2020; pp. 191-207.
36. Canales A, Benedí J, Nus M, Librelotto J, Sánchez-Montero JM, Sánchez-Muniz FJ. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *J Am Coll Nutr* 2007; 26(3): 225-232.
37. Zeng Y, Pu X, Du J, Yang X, Li X, Mandal MSN, Yang T, Yang J. Molecular mechanism of functional ingredients in barley to combat human chronic diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 3836172.
38. Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, Collaborators: Ayo J, Carballo J, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Serrano A, Bastida S, Benedí J, Canales A, Librelotto J, Nus M, Blanco-Navarro I, Blázquez-García S, Granado-Lorencio F, Herrero-Barbudo C. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem* 2010; 123(4): 959-67.
39. Cofrades S, Benedí J, Garcimartín A, Sánchez-Muniz FJ, Jiménez-Colmenero F. A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: From technological development to assessment of healthy properties. *Food Res Intern* 2017; 99: 1084-94.
40. González-Torres L, Matos C, Vázquez-Velasco M, Santos-López JA, Sánchez-Martínez I, García-Fernández C, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Glucomannan- and glucomannan plus spirulina-enriched pork affect liver fatty acid profile, LDL receptor expression and antioxidant status in Zucker fa/fa rats fed atherogenic diets. *Food Nutr Res* 2016; 61(1): 1264710.
41. Garcimartín A, Santos-López JA, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Silicon-enriched restructured pork affects the lipoprotein profile, VLDL Oxidation, and LDL receptor gene expression in aged rats fed an atherogenic diet. *J Nutr* 2015; 145(9): 2039-45.
42. Santos-López JA, Garcimartín A, Merino P, López-Oliva ME, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Effects of silicon vs. hydroxytyrosol-enriched restructured pork on liver oxidation status of aged rats fed high-saturated/high-cholesterol diets. *PloS one* 2016; 11(1): e0147469.
43. Santos-López A, Garcimartín A, Bastida S, Bautista-Ávila M, González-Muñoz MJ, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Lipoprotein profile in aged rats fed chia oil- or hydroxytyrosol-enriched pork in high cholesterol/high saturated fat diets. *Nutrients* 2018; 10(12): 1830.
44. Delgado-Pando G, Celada P, Sánchez-Muniz FJ, Jiménez-Colmenero F, Olmedilla-Alonso B. Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk: a placebo-controlled study. *Eur J Nutr* 2014; 53(1): 83-93.
45. Celada P, Sánchez-Muniz FJ, Delgado-Pando G, Bastida S, Rodilla ME, Jiménez-Colmenero F, Olmedilla-Alonso B. Effects of improved fat meat products consumption on emergent cardiovascular disease markers of male volunteers at cardiovascular risk. *J Physiol Biochem* 2016; 72(4): 669-78.
46. Celada P, Olmedilla-Alonso B, Delgado-Pando G, Raposo R, Jiménez-Colmenero F, Garcimartín A, Sánchez-Muniz FJ. Coagulation, thrombogenesis, and insulin resistance markers in increased cardiovascular risk subjects consuming improved fat meat products. *J Am Coll Nutr* 2019; 38(4): 334-41.

### Healthy and functional meat products.

#### Scientific evidence of the AFUSAN group

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 603-626



47. Macho-González A, Garcimartín A, López-Oliva ME, Celada P, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Carob-fruit-extract-enriched meat modulates lipoprotein metabolism and insulin signaling in diabetic rats induced by high-saturated-fat diet. *J Funct Foods* 2020; 64:103600.
48. Macho-González A, Garcimartín A, Redondo N, Cofrades S, Bastida S, Nova E, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ, Marcos A, López-Oliva ME. Carob fruit extract-enriched meat, as preventive and curative treatments, improves gut microbiota and colonic barrier integrity in a late-stage T2DM model. *Food Res Int.* 2021; 141: 110124.
49. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev Esp Cardio* 2009; 62(10): 1161-78.
50. Ros E. Nuts and CVD. *Br J Nutr* 2015; 113 Suppl 2: S111-20.
51. Nus, Ruperto M, Sánchez-Muniz FJ. Frutos secos y riesgo cardiovascular. Una perspectiva española. *Arch Latinoam Nutr* 2004; 54: 137-48.
52. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans* 2017; 45(5): 1105-15.
53. Librelotto J, Bastida S, Serrano A, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ. Changes in fatty acids and polar material of restructured low-fat or walnut-added steaks pan-fried in olive oil. *Meat Sci* 2008; 80(2): 431-41.
54. Serrano A, Librelotto J, Cofrades S, Sánchez-Muniz F, Jiménez-Colmenero F. Composition and physicochemical beef steaks containing walnuts as characteristics of restructured affected by cooking method. *Meat Sci* 2007; 77(3): 304-13.
55. Canales A, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Platelet aggregation, eicosanoid production and thrombogenic ratio in individuals at high risk consuming walnut-enriched meat. A cross-over, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 102: 134-41.
56. Berryman CE, Grieger JA, West SG, Chen CYO, Blumberg JB, Rothblat GH, Sankaranarayanan S, Kris-Etherton PM. Acute consumption of walnuts and walnut components differentially affect postprandial lipemia, endothelial function, oxidative stress, and cholesterol efflux in humans with mild hypercholesterolemia. *J Nutr* 2013; 143(6): 788-94.
57. Chen BB, Han Y, Pan XT, Yan JH, Liu WJ, Li YF, Lin X, Xu SH, Peng XE. Association between nut intake and non-alcoholic fatty liver disease risk: a retrospective case-control study in a sample of Chinese Han adults. *BMJ Open* 2019; 9(9): e028961.
58. Canales A, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Corella D, Guillén M, Benedí J. Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(6): 703-10.
59. Gómez-Zavaglia A, Lage MAP, Jiménez-López C, Mejuto JC, Simal-Gandara J. The potential of seaweeds as a source of functional ingredients of prebiotic and antioxidant value. *Antioxidants* 2019; 8(9): 406.
60. Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* 2000; 20: 585-98.
61. Rodenas de la Rocha S, Sánchez-Muniz FJ, Gómez-Juaristi M, Larrea-Marín MT. Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. *J Food Compos Anal* 2009; 22: 330-6.
62. Larrea-Marín MT, Pomares-Alfonso MS, Gómez-Juaristi M, Sánchez-Muniz FJ, de la Rocha SR. Validation of an ICP-OES method for macro and trace element determination in Laminaria and Porphyra seaweeds from four different countries. *J Food Compos Anal* 2010; 23(8): 814-20.
63. Bocanegra A, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 2006; 95(4): 696-702.
64. Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchant SS, Helliwell KE, Smith AG, Camire ME, Brawley SH. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J App Phycol* 2017; 29(2): 949-82.
65. Cofrades S, Lopez-Lopez I, Ruiz-Capillas C, Triki M, Jiménez-Colmenero F. Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Sci* 2011; 87(4): 373-80.
66. López-López I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sánchez-Muniz F, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci* 2009; 83(3): 492-8.
67. López-López I, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F. Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Sci* 2009; 83(2): 255-62.
68. Pogorzelska E, Godziszewska J, Brodowska M, Wierzbicka A. Antioxidant potential of Haematococcus pluvialis extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage. *Meat Sci* 2018; 135: 54-61.
69. Roohinejad S, Koubaa M, Barba FJ, Saljoughian S, Amid M, Greiner R. Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Res Int* 2017; 99: 1066-83.
70. Schultz-Moreira AR, Benedí J, González Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Sánchez-Reus M, González-Muñoz M, Sánchez-Muniz FJ. Effects of diet enriched with restructured meats, containing Himanthalia elongata, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem* 2011; 129(4): 1623-30.



71. Olivero-David R, Schultz-Moreira A, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Reus MJ, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Effects of nori- and wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br J Nutr* 2011; 106(10): 1476-86.
72. Schultz-Moreira A, Olivero-David R, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Benedí J, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Protective effects of sea spaghetti-enriched restructured pork against dietary cholesterol: effects on arylesterase and lipoprotein profile and composition of growing rats. *J Med Food* 2014; 17(8): 921-8.
73. Schultz-Moreira A, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Wakame and nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Human Nutr* 2010; 65(3): 290-8.
74. Fernández-Segovia I, Lerma-García MJ, Fuentes A, Barat JM. Characterization of Spanish powdered seaweeds: composition, antioxidant capacity and technological properties. *Food Res Int* 2018; 111: 212-9.
75. Lordan S, Ross RP, Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar Drugs* 2011; 9(6): 1056-1100.
76. Bocanegra A, Macho-González A, Garcimartín A, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Whole alga, algal extracts, and compounds as ingredients of functional foods: Composition and action mechanism relationships in the prevention and treatment of Type-2 Diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(8): 3816.
77. González-Torres L, Vázquez-Velasco M, Olivero-David R, Bastida S, Benedí J, Raposo González R., González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Glucomanan and glucosaminan plus spirulina added to pork significantly block dietary cholesterol effects on lipoproteinaemia, arylesterase activity and CYP7A1 expression in Zucker fa/fa rats. *J Physiol Biochem* 2015; 71(4): 773-84.
78. González Torres L. Efectos sobre el metabolismo lipoproteico y estrés oxidativo en ratas Zucker fa/fa de cárnicos enriquecidos con glucomanano y espirulina. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 2016.
79. Vázquez-Velasco M. Efectos del surimi de calamar enriquecido con glucomano y/o espirulina sobre marcadores del síndrome metabólico en ratas Zucker fa/fa. Tesis Doctoral Europea. Madrid: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 2015.
80. Santos López JA. Efectos del consumo de matrices cárnicas modificadas sobre marcadores del metabolismo lipídico y oxidación hepática. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid Madrid. 2017.
81. Santos-López JA, Garcimartín A, López-Oliva ME, Bautista-Ávila M, González-Muñoz MJ, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Chia oil-enriched restructured pork effects on oxidative and inflammatory status of aged rats fed high cholesterol/high fat diets. *J Med Food* 2017; 20(5): 526-34.
82. Konieczka P, Czauderna M, Smulikowska S. The enrichment of chicken meat with omega-3 fatty acids by dietary fish oil or its mixture with rapeseed or flaxseed-effect of feeding duration dietary fish oil, flaxseed, and rapeseed and n-3 enriched broiler meat. *Anim Feed Sci Technol* 2017; 223: 42-52.
83. Alagawany M, Elnesr SS, Farag MR, Abd El-Hack ME, Khafaga AF, Taha AE, Tiwari R, Yattoo MI, Bhatt P, Khurana SK, et al. Omega-3 and omega-6 fatty acids in poultry nutrition: effect on production performance and health. *Animals* 2019; 9(8):573.
84. Dannenberger D, Nuernberg K, Herdmann A, Nuernberg G, Hagemann E, Kienast W. Dietary PUFA intervention affects fatty acid- and micronutrient profiles of beef and related beef products. *Foods* 2013; 2(3): 295-309.
85. Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR, Enser M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* 2004; 66(1): 21-32.
86. Gómez-Estaca J, Pintado T, Jiménez-Colmenero F, Cofrades S. The effect of household storage and cooking practices on quality attributes of pork burgers formulated with PUFA- and curcumin-loaded oleogels as healthy fat substitutes. *LWT Food Sci Technol* 2020; 119: 108909.
87. Freire M, Cofrades S, Serrano-Casas V, Pintado T, Jimenez MJ, Jiménez-Colmenero F. Gelled double emulsions as delivery systems for hydroxytyrosol and n-3 fatty acids in healthy pork patties. *J Food Sci Technol* 2017; 54(12): 3959-68.
88. Sánchez-Muniz FJ, Olivero-David R, Triki M, Salcedo L, González-Muñoz MJ, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F, Benedí J. Antioxidant activity of Hypericum perforatum L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Res Int* 2012; 48(2): 909-15.
89. Pintado T, Cofrades S. Quality characteristics of healthy dry fermented sausages formulated with a mixture of olive and chia oil structured in oleogel or emulsion gel as animal fat replacer. *Foods* 2020; 9(6): 830.
90. Bermejo LM, López-Plaza B, Weber TK, Palma-Milla S, Iglesias C, Reglero G, Gómez-Candela C. Impact of cooked functional meat enriched with omega-3 fatty acids and rosemary extract on inflammatory and oxidative status; a randomised, double-blind, crossover study. *Nutr Hosp* 2014; 30(5): 1084-91.
91. Kumar F, Tyagi PK, Mir NA, Dev K, Begum J, Biswas A, Sheikh SA, Tyagi PK, Sharma D, Sahu B, et al. Dietary flaxseed and turmeric is a novel strategy to enrich chicken meat with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids with better oxidative stability and functional properties. *Food Chem* 2020; 305: 125458.

#### Healthy and functional meat products.

#### Scientific evidence of the AFUSAN group

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 603-626

92. Celada P, Delgado-Pando G, Olmedilla-Alonso B, Jiménez-Colmenero F, Ruperto M, Sánchez-Muniz FJ. Impact of improved fat-meat products consumption on anthropometric markers and nutrient intakes of male volunteers at increased cardiovascular risk. *Nutr Hosp* 2015; 32(2): 710-21.
93. Sánchez-Muniz FJ, Macho-González A, Garcimartín A, Santos-López JA, Benedí J, Bastida S, González-Muñoz MJ. The nutritional components of beer and its relationship with neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Nutrients* 2019; 11(7): 1558.
94. Sánchez-Muniz FJ, González-Muñoz MJ, Macho-González A, Benedí J, Garcimartín A, López-Oliva E, Santos-López JA, Bastida S, AFUSAN Research Group. Cuando el silicio transmuta en oro. *JONNPR* 2020; 5(2): 202-11.
95. Jurkic LM, Cepanec I, Pavelic SK, Pavelic K. Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: new perspectives for therapy. *Nutr Metabol* 2013; 10: 2.
96. González-Muñoz MJ, Garcimartín A, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, Orellana JM, Peña-Fernández A, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Silicic acid and beer consumption reverses the metal imbalance and the prooxidant status induced by aluminum nitrate in mouse brain. *J Alzheimers Dis* 2017; 56(3): 917-27.
97. Garcimartín A, Merino JJ, Santos-López JA, López-Oliva ME, González MP, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J. Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere* 2015; 135: 217-24.
98. Cofrades S, Bou R, Gómez-Nieto B, Procopio JR, Errabi A, Jiménez-Colmenero F. Physicochemical properties and encapsulation of silicon in double emulsions for healthier food applications. *J Food Sci Technol* 2016; 53(11): 3884-93.
99. Garcimartín A, López-Oliva ME, Macho-González A, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Hypoglycaemic and hypotriglyceridaemic postprandial properties of organic silicon. *J Funct Foods* 2017; 29: 290-4.
100. Garcimartín A, López-Oliva ME, Santos-López JA, García-Fernández RA, Macho-González A, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Silicon alleviates nonalcoholic steatohepatitis by reducing apoptosis in aged Wistar rats fed a high-saturated fat, high-cholesterol diet. *J Nutr* 2017; 147(6): 1104-12.
101. Hernández-Martín M, Bocanegra A, Redondo-Castillejo R, Macho-González A, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J, Bastida S, García-Fernández R, Garcimartín A, López-Oliva ME. Could duodenal molecular mechanisms be involved in the hypocholesterolemic effect of silicon used as functional ingredient in late-stage type 2 Diabetes Mellitus? *Mol Nutr Food Res*. 2022; e2200104.
102. Mehta N, Ahlawat SS, Sharma DP, Dabur RS. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products-a critical review. *J Food Sci Technol* 2015; 52(2): 633-47.
103. Saldaña P, Bastida S, Macho-González A, Sánchez-Muniz FJ. Functional foods as an alternative to increase the consumption of dietary fiber and proanthocyanidins. Possible effects on the gut microbiota. *JONNPR* 2020; 5(12): 1575-98.
104. Verma AK, Banerjee R. Dietary fibre as functional ingredient in meat products: a novel approach for healthy living - a review. *J Food Sci Technol* 2010; 47(3): 247-57.
105. Saura-Calixto F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J Agric Food Chem* 2011; 59(1): 43-9.
106. Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The Role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci* 2011; 76(1): R6-15.
107. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 2016; 8: 33-42.
108. Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Hušek A, Bačun-Družina V, Komes D. 1 - Overview of polyphenols and their properties. En: Galanakis CM (Ed.). *Polyphenols: Properties, recovery, and applications*. Oxford: Woodhead Publishing, 2018; pp. 3-44.
109. Martínez-Huélamo M, Rodríguez-Morató J, Boronat A, de la Torre R. Modulation of Nrf2 by olive oil and wine polyphenols and neuroprotection. *Antioxidants* 2017; 6(4): 73.
110. Jiménez-Colmenero F, Cofrades S, Herrero AM, Ruiz-Capillas C. Implications of domestic food practices for the presence of bioactive components in meats with special reference to meat-based functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58(14): 2334-45.
111. Shah MA, Bosco SJD, Mir SA. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci* 2014; 98(1): 21-33.
112. Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Olivero R, Pérez-Olleros L, Ruiz-Roso B, Jiménez-Colmenero F. Antioxidant activity of carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chem* 2009; 116(3): 748-54.
113. Bastide NM, Naud N, Nassy G, Vendevre JL, Tache S, Gueraud F, Hobbs DA, Kuhnle GG, Corpet DE, Pierre FHF. Red wine and pomegranate extracts suppress cured meat promotion of colonic mucin-depleted foci in carcinogen-induced rats. *Nutr Cancer* 2017; 69(2): 289-98.
114. Fernández J, García L, Monte J, Villar CJ, Lombo F. Functional anthocyanin-rich sausages diminish colorectal cancer in an animal model and reduce pro-inflammatory bacteria in the intestinal microbiota. *Genes* 2018; 9(3):133.
115. Macho-González A. *Cárnicos funcionales enriquecidos en extracto de algarroba (Ceratonia siliqua, L.) en la prevención y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2*. Tesis Doctoral Internacional. Madrid: Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid 2021.





116. Macho-González A, Garcimartín A, López-Oliva ME, Bertocco G, Naes F, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J. Fiber purified extract of carob fruit decrease carbohydrate absorption. *Food and Function* 2017; 8(6): 2258-65.
117. Macho-González A, Garcimartín A, Naes F, López-Oliva ME, Amores-Arrojo Á, Gonzales-Muñoz MJ, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Effects of fiber purified extract of carob fruit on fat digestion and postprandial lipemia in healthy rats. *J Agric Food Chem* 2018; 66(26): 6734-41.
118. Vázquez-Velasco M, Esperanza Díaz L, Lucas R, Gómez-Martínez S, Bastida S, Marcos A, Sánchez-Muniz FJ. Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *Br J Nutr* 2011; 105(10): 1448-52. Corrigendum in *Br J Nutr* 2011; 105(11): 1712.
119. Macho-González A, Garcimartín A, López-Oliva E, Benedí J, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Papel de las proantocianidinas sobre la microbiota, permeabilidad intestinal e inflamación. En: Marcos A, Gómez-Martínez S (Eds.). *Inmunonutrición. Estilo de vida*. 2nd edición. Buenos Aires: Panamericana 2020. pp. 245-66.
120. Macho-González A, Garcimartín A, López-Oliva ME, Ruiz-Roso B, Martín de la Torre I, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Can Carob-fruit-extract-enriched meat improve the lipoprotein profile, VLDL-oxidation, and LDL receptor levels induced by an atherogenic diet in STZ-NAD-diabetic rats? *Nutrients*. 2019; 11(2): pii:E332.
121. Macho-González A, López-Oliva ME, Merino JJ, García-Fernández RA, Redondo-Castillejo R, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J. Carob fruit extract-enriched meat improves pancreatic beta-cell dysfunction, hepatic insulin signaling and lipogenesis in late-stage type 2 diabetes mellitus model. *J Nutr Biochem* 2020; 84: 10846.
122. Corella D, Coltell O, Portoles O, Sotos-Prieto M, Fernández-Carrión R, Ramírez-Sabio JB, Zanon-Moreno V, Mattei J, Sorli JV, Ordovas JM. A guide to applying the sex-gender perspective to nutritional genomics. *Nutrients* 2019; 11(1): 4.
123. Lai CQ, Smith CE, Parnell LD, Lee YC, Corella D, Hopkins P, Hidalgo BA, Aslibekyan S, Province MA, Absher D, et al. Epigenomics and metabolomics reveal the mechanism of the APOA2-saturated fat intake interaction affecting obesity. *Am J Clin Nutr* 2018; 108(1): 188-200.
124. Ferguson JF, Allayee H, Gerszten RE, Ideraabdullah F, Kris-Etherton PM, Ordovás JM, Rimm EB, Wang TJ, Bennett BJ. Nutrigenomics, the microbiome, and gene-environment interactions: new directions in cardiovascular disease research, prevention, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9(3): 291-313.
125. Ferguson LR, De Caterina R, Görmán U, Allayee H, Kohlmeier M, Prasad C, Choi MS, Curi R, de Luis DA, Gil Á, et al. Guide and position of the international society of nutrigenetics/nutrigenomics on personalised nutrition: Part 1 - Fields of precision nutrition. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2016; 9(1): 12-27.
126. Sales NMR, Pelegrini PB, Goersch MC. Nutrigenomics: Definitions and advances of this new science. *J Nutr Metab* 2014; 2014: 202759.
127. Sánchez-Muniz FJ, Canales A, Nus M, Bastida S, Guillen M, Corella D, Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Benedí J. The antioxidant status response to low-fat and walnut paste-enriched meat differs in volunteers at high cardiovascular Risk carrying different PON-1 polymorphisms. *J Am Coll Nutr* 2012; 31(3): 194-205.
128. Nus M, Frances F, Librelotto J, Canales A, Corella D, Sánchez-Montero JM, Sánchez-Muniz FJ. Arylesterase activity and antioxidant status depend on PON1-Q192R and PON1-L55M polymorphisms in subjects with increased risk of cardiovascular disease consuming walnut-enriched meat. *J Nutr* 2007; 137(7): 1783-8.
129. Aguirre-Portolés C, Fernández LP, Ramírez de Molina A. Precision nutrition for targeting lipid metabolism in colorectal cancer. *Nutrients* 2017; 9(10): 1076.
130. Ma N, Tian Y, Wu Y, Ma X. Contributions of the interaction between dietary protein and gut microbiota to intestinal health. *Curr Protein Pept Sci* 2017; 18(8): 795-808.
131. Jeon S-M, Shin E-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Biol Med* 2018; 50(4): 20.

Si desea citar nuestro artículo:

**Productos cárnicos saludables y funcionales.**

**Evidencia científica del Grupo AFUSAN**

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 603-626

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.25>

### Healthy and functional meat products.

### Scientific evidence of the AFUSAN group

Francisco José Sánchez-Muniz, Adrián Macho-González, Sara Bastida, et al.

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 603-626



## MUJERES EN LA ACADEMIA: LOS INICIOS DE LA PRESENCIA FEMENINA EN NUESTRA CORPORACIÓN

### WOMEN IN THE ACADEMY: THE BEGINNINGS OF THE FEMALE PRESENCE IN OUR CORPORATION

Rosa Basante Pol

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

corresponding author: rbasante@ucm.es

#### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

#### RESUMEN

El 6 de enero 1932, Domingo Barnés Salinas, miembro del Ministerio de Instrucción Pública y Bellas Artes dirigido por Fernando de los Ríos, en el segundo gobierno de Manuel Azaña, accedió al deseo del Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid de modificar el nombre de esta Corporación por el de "Academia Española de Farmacia", con la finalidad de marcar, con mayor claridad, sus objetivos de "promover y propagar los adelantos de la Ciencia Farmacéutica, fomentar la cultura y contribuir al prestigio de los farmacéuticos". De los 200 miembros que componían el Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid en estos inicios de 1932, todos farmacéuticos y residentes en Madrid, tan solo ocho eran mujeres, un número muy pequeño que hemos de valorar dentro de la situación social y del rol asignado a la mujer en la época; simplemente las dificultades que tenían para cursar estudios universitarios era todo un reto.

Tras la Guerra Civil, y las correspondientes depuraciones, aquellos antiguos académicos que desearan seguir perteneciendo a la Corporación quedaban obligados a presentar la correspondiente solicitud. Ninguna mujer presentó su candidatura a miembro de número, solo tres se mantuvieron en el estatus de académicas correspondientes: Josefina Bayle, Ascensión Mas-Guindal Calderero y Petra Ascensión Vidal Piazuelo.

Desde 1946, mediante un decreto firmado por José Ibáñez Martín, Ministro de Educación Nacional, la Academia Nacional de Farmacia quedó incorporada al Instituto de España. La entrada de una mujer a esta Corporación no ocurrirá hasta 1955, entonces se incorporará, como académica correspondiente, María Dolores Stamm Menéndez. Tras ella, de manera paulatina, fueron admitidas otras más hasta que, en 1987, una mujer alcanzó el reconocimiento de excelencia como académica de número; será María Cascales Angosto la primera en lograrlo desde que nuestra Corporación formara parte del Instituto de España.

El camino que estas mujeres tuvieron que recorrer hasta alcanzar el máximo reconocimiento, al igual que en otras instituciones científicas o académicas, fue largo y —no pocas veces— preñado de dificultades. Nuestro propósito es analizar quiénes fueron estas pioneras y cuáles los medios y modos que las llevaron a alcanzar sus objetivos.

Nuestra investigación pretende reintegrar sus nombres en la historia, dejar constancia de su esfuerzo, dedicación y constancia y poner en valor su excelencia científica; para ello nos serviremos, básicamente, de los documentos conservados en el Archivo de la Real Academia Nacional de Farmacia.

#### ABSTRACT

On January 6, 1932 Domingo Barnés Salinas, member of the Ministry of Public Instruction and Fine Arts, directed by Fernando de los Ríos, in the second government of Manuel Azaña, agreed to the desire of the Royal College of Pharmacists of Madrid, to modify the name of this Corporation by the "Spanish Academy of Pharmacy", in order to mark more clearly its objectives of "promoting and propagating the advances of Pharmaceutical Science, promote culture and contribute to the prestige of pharmacists". Of the 200 members that made up the Royal College of Pharmacists of Madrid at the beginning of 1932, all pharmacists and residents in Madrid, only eight were women, a very small number that we have to analyze within the social situation and the role of women at the time; simply the difficulties they had to pursue university studies was a challenge.

After the Civil War, and the corresponding purges, those former academics who wished to continue belonging to the Corporation were obliged to present the corresponding request. No woman presented her candidacy for full member, only three remained in the status of corresponding Academics: Josefina Bayle, Ascensión Mas-Guindal Calderero and Petra Ascensión Vidal Piazuelo.

Since 1946, by a decree signed by José Ibáñez Martín, Minister of National Education, the National Academy of Pharmacy was incorporated into the Institute of Spain, but we do not know the entry of a woman to this Corporation until 1955, then María Dolores Stamm Menéndez will be incorporated, as the corresponding academic. After her, some were admitted until, in 1987, a woman reached the recognition of excellence as a number Academic, it will be María Cascales Angosto, the first to achieve it since our Corporation was part of the Institute of Spain.

The road that these women had to travel to reach the maximum recognition, as in other scientific or academic institutions, was long and — not infrequently — full of difficulties. Our purpose is to analyze who these pioneers were and what were the means and ways that led them to achieve their objectives.

Our research aims to re-integrate their names into history, record their effort, dedication and perseverance and value their scientific excellence; for this we will use, basically, the documents preserved in the Archive of the Royal National Academy of Pharmacy.

#### Palabras Clave:

mujer  
académica  
academia nacional de  
farmacia  
madrid  
españa

#### Keywords:

women  
academy  
academy of pharmacy  
madrid  
Spain



## 1. EL ANHELADO DESEO DE SER ACADEMIA

Los farmacéuticos, como otros profesionales o artesanos, sintieron el deseo y la necesidad de unirse para proteger sus intereses profesionales desde el siglo XVI, así surgieron las diferentes corporaciones y cofradías que, acordes a la evolución de la sociedad, fueron adaptando sus normas a las exigencias de un mundo cambiante.

El camino recorrido por los farmacéuticos, primero para conseguir que su profesión fuera considerada 'arte científico' en 1650; más tarde, en 1737, para lograr la aprobación de los estatutos del Real Colegio de Boticarios de Madrid y, finalmente, la consideración de unos estudios universitarios normalizados en 1845, fue tortuoso pero forjó la urdimbre de una profesión sanitaria que hubo de tomar dos direcciones: una, tras la colegiación obligatoria en 1916, para el ejercicio de la profesión, con la meta puesta en los colegios provinciales de farmacéuticos, cuyos fines eran -primordialmente-, profesionales; y, otra, en el mantenimiento del Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid que se decantó radicalmente por los temas científicos de la profesión. La escisión conllevó a los farmacéuticos a decantarse por una u otra corporación, en función de su actividad profesional, aunque no pocos profesionales optaron por ambas; de los "6.000 farmacéuticos existentes en España, solo 238 pertenecían al Real Colegio" (1).

Anhelaban los miembros del Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid en constituirse en Real Academia, a semejanza de las existentes nacidas en el periodo ilustrado, y aunaron esfuerzos y voluntades para lograr su objetivo.

Los esfuerzos no fueron baldíos y la Real Academia Nacional de Farmacia nació, como Academia Española de Farmacia, el 6 de enero de 1932 (2); ello fue debido "al impulso de políticos y ministros republicanos e institucionistas" (3), posiblemente gracias al empeño del académico, catedrático y ministro de Marina, Francisco Giral Pereira, amigo personal de Domingo Barnés Salinas, miembro del Ministerio de Instrucción Pública y Bellas Artes, dirigido por Fernando de los Ríos, en el Gobierno de Manuel Azaña, quien firmó la referida disposición. Los problemas surgidos con la Academia Española de la Lengua, por el término coincidente de 'Española', hace que, pocos meses después, el 13 de mayo de 1932, Domingo Barnés firmara la disposición por la cual pasó a denominarse Academia Nacional de Farmacia.

Los primeros estatutos de la Corporación, aprobados por orden ministerial de 16 de junio de 1932, definen a la Academia haciendo referencia a sus orígenes: señala los primeros Estatutos, de 1589, correspondientes a la Congregación y Colegio del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación, haciendo hincapié en el carácter de corporación oficial. Nace con la finalidad de "pro-

mover y propagar los adelantos de la Ciencia farmacéutica, fomentar la cultura y contribuir al prestigio de los farmacéuticos" (4). Es decir, recalca su labor científica.

Estos primeros estatutos de la nueva Corporación se ocupan, en su título II, capítulo primero, 'De los Académicos'; enumera tres tipos: honorarios, de número y correspondientes. Respecto a los académicos de número explicita: "Serán Académicos de número los farmacéuticos residentes en Madrid, ejerzan o no la profesión, que soliciten su ingreso o sean propuestos por la Academia y admitidos reglamentariamente" (4). Respecto a los correspondientes, afirma que serán: "farmacéuticos no residentes habitualmente en Madrid, y los de número cuando trasladen su residencia a otra localidad" (4). En ningún caso se presenta limitación en la cantidad de miembros; realmente entendemos que no era difícil ser académico en esta primera etapa, sólo hacía falta voluntad para ello.

Los deberes de académicos de número y correspondiente sí eran diferentes, al igual que sus derechos:

"Los Académicos de número contraen además la obligación de contribuir al sostenimiento de la Academia con las cuotas de ingreso y ordinaria que señale el Reglamento y las extraordinarias que se establezcan, y aceptar los cargos para los que se les elija si no hay impedimento grave. Los Académicos correspondientes abonarán sólo derechos de ingreso" (artículo 7).

Es decir, los académicos numerarios tenían que abonar de su peculio no solo los derechos de ingreso sino las cuotas, entre otras la suscripción a la revista, órgano de expresión de la Academia, *Anales de la Academia Nacional de Farmacia*, que este año celebra su noventa aniversario, perdiendo -en caso de impago- la condición de académico.

La Junta de Gobierno, órgano director de la Academia, quedaba compuesta por presidente, vicepresidente, secretario, tesorero y bibliotecario; se establecen dos comisiones: la de admisiones y la económica, y siete secciones: 1. Ciencias Físicoquímicas, 2. Ciencias Naturales, 3. Análisis, 4. Higiene y Bacteriología, con sueros y vacunas, 5. Legislación y Deontología, 6. Historia y Bibliografía y 7. Farmacia Galénica e industrias farmacéuticas. Cada sección elegiría, entre sus miembros -de número o correspondientes- a su presidente, vicepresidente y dos secretarios.

En 1935 se redacta un proyecto de modificación de los estatutos, que cristaliza en junio de 1936, aunque no nos consta que llegara a ver la luz (5); tal vez lo más destacable de esta norma sea la limitación a 40 de los miembros numerarios, de los cuales 35 serían farmacéuticos y los cinco restantes cultivadores de "ciencias afines". El número de académicos correspondientes sería ilimitado. Los numerarios deberían residir en Madrid y los correspondientes en Madrid o en cualquier otro lugar de España, pero para ser admitidos tendrían que presentar un trabajo original del que se eximía



a los de número. Para potenciar el fin científico de la Academia se exigía para su ingreso, a los académicos de número, méritos científicos o/y profesionales destacados.

Tras la Guerra Civil, el Subsecretario del Ministerio de Educación, Alfonso García Valdecasas, aprueba los acuerdos de la Real Academia de Farmacia, referentes al restablecimiento de la vida científica de la Corporación, que conservará el título de Real, sus trabajos de 'depuración' de sus académicos y los de reorganización de la Corporación (3).

Finalizada la Guerra Civil la Academia Nacional de Farmacia procedió, como el resto de los organismos con vinculación estatal, a la realización de un proceso de 'depuración', de acuerdo con las normas dictadas por el Ministerio de Educación. Se designó una Junta depuradora para asumir estas funciones. El procedimiento consistía en enviar, a los antiguos académicos, una circular, con rango de declaración jurada, en la que se solicitaban los datos personales y profesionales, a la par que se les preguntaba sobre sus deseos de seguir perteneciendo a la Corporación; en caso afirmativo, deberían contestar un cuestionario normalizado, con dieciséis preguntas, además de consignar los nombres de los farmacéuticos que supiesen "fallecidos y asesinados desde el 18 de julio, para completar la información abierta por esta Academia" (3). Realmente el procedimiento no fue una 'depuración', sino una 'autodepuración': tan solo presentaron el documento aquellos que sabían que iban a ser admitidos; a los encarcelados o exiliados, presumiblemente, ni siquiera se le envió la solicitud o, al menos, no presentaron declaración jurada; sirvan de ejemplo los casos de las hermanas Rosa María y Concepción Martín de Antonio, José Giral Pereira o Alberto Chalmeta (6). Examinadas las declaraciones juradas presentadas ante la Junta depuradora, esta envió, el 13 de octubre de 1939, a todos los académicos calificados como 'Adicto al Régimen', una circular confirmando su continuidad como académicos correspondientes; para pasar a ser académicos de número deberían dirigir, al presidente de la Real Academia de Farmacia, una solicitud en la que hiciesen constar sus méritos, si era licenciado o doctor, y el expreso deseo de que sus expedientes pasasen a la "Comisión nombrada al efecto" (3). Tres mujeres: Amalia Pla Riaza, Ascensión Mas-Guindal y Petra Vidal Piazuelo manifestaron su deseo de continuar perteneciendo a la Corporación y, con ello, su no pertenencia a la masonería.

## 2. LAS PRIMERAS ACADÉMICAS NUMERARIAS DE LA ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Los estatutos de 1932 obligaban a la publicación anual de los miembros de la Academia. La primera relación se hace pública en diciembre de 1933 (6); de los 200 académicos de número, considerados fundadores de la Academia, tan solo figuran siete mu-

jer: María Josefina Bayle, Mercedes Jurado, María Concepción Martín de Antonio, Rosa María Martín de Antonio, María Ascensión Mas-Guindal, Amalia Pla Riaza y Petra Ascensión Vidal Piazuelo; en un documento mecanografiado, conservado en el archivo de la Corporación, que acompaña a los Estatutos aprobados en 1932, figura otra mujer; María Luisa Sánchez Soto (7). Serían ocho, que conozcamos, las numerarias fundadoras, el 4% del total de miembros, de las cuales cuatro desempeñaron cargos en los órganos de gobierno de la Academia, bien como miembros de alguna de las comisiones o de las secciones correspondientes. Lógicamente las numerarias, todas farmacéuticas ejercientes o no, eran residentes en Madrid (8) como exigían los Estatutos.

Sin duda ser académico numerario era un honor, significaba haber alcanzado el más alto nivel de excelencia, lo que no excluía que, económicamente, fuera gravoso; pero era un modo de colaborar al mantenimiento de la Academia (9).

Tras la modificación estatutaria propuesta en junio de 1936, todas las mujeres fueron relegadas a académico correspondiente, quizás por falta de méritos científicos constatados u otras causas, lo cierto es que, en 1939, ninguna llegó a acceder a numeraria, porque tampoco hicieron la preceptiva solicitud para ello (10). Cabría preguntarse el por qué, ¿no se consideraban con méritos suficientes o, sabiendo la gran reducción ocurrida en el número de académicos de número, entendían que no serían elegidas?

Lo que es un hecho cierto es que, tras la Guerra Civil y hasta el enero de 1987, en que tomó posesión de su plaza de aca-

JUNTA DE GOBIERNO	
Presidente...	José Casares Gil.
Vicepresidente 1.º...	Joaquín Mas y Guindal.
Vicepresidente 2.º...	Toribio Zúñiga S. Cerrado.
Vicepresidente 3.º...	Manuel González Juárez.
Fiscal-Interventor...	Felipe Gracia Dorado.
Tesorero...	Wenceslao Carredano.
Bibliotecario...	Francisco J. Blanco Juste.
Secretario general...	Eugenio Sella Martí.
Vicesecretario...	Luis Palacios M. Pelletier.
Archivero...	Rafael Sánchez Martínez.
Delegado de Relaciones Culturales.	Celso Revert Cuillas.
SECCIONES	
Primera.—QUÍMICA GENERAL E INORGÁNICA	
Presidente...	José Casares Gil.
Vicepresidente...	José Rando S. Bravo.
Secretario...	Eugenio Sella Martí.
Vicesecretario...	Enrique Ferrero Ponsal.
Tercera.—CIENCIAS NATURALES	
Presidente...	Joaquín Mas y Guindal.
Vicepresidente...	Felipe Gracia Dorado.
Secretario...	Ascensión Mas Calderero.
Vicesecretario...	José de la Vega y Portilla.
Quinta.—BROMATOLOGÍA E HIGIENE	
Presidente...	Modesto Manestre Ibáñez.
Vicepresidente...	Luis Mas Eleisorgui.
Secretario...	Miguel Comenge Gorge.
Vicesecretario...	Pascual Borrallo Nueda.
Séptima.—LEGISLACIÓN Y DEONTOLOGÍA	
Presidente...	Ramón Herrera de la Orden.
Vicepresidente...	Alberto W. Blanco.
Secretario...	Fernando Herguera y Vidal.
Vicesecretario...	José Lenchu de Lara.
Novena.—FARMACIA GALENICA	
Presidente...	Luis Pérez de Albeniz.
Vicepresidente...	Emilio Alcobilla.
Secretario...	Luis Benito Campomar.
Vicesecretario...	Ricardo Labiaga Cernuda.
Segunda.—QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOQUÍMICA	
Presidente...	Antonio Fianarro.
Vicepresidente...	Rafael Escribano Ortega.
Secretario...	Antonio de la Vega Samper.
Vicesecretario...	Rafael Sánchez Martínez.
Cuarta.—MICROBIOLOGÍA	
Presidente...	Juan Bautista Gómez.
Vicepresidente...	Higinio Esteban.
Secretario...	Ramón Turrientes.
Vicesecretario...	Celestino Grillo Carr.
Sexta.—FARMACOLOGÍA	
Presidente...	Manuel González Juárez.
Vicepresidente...	Salvador Serra Abell.
Secretario...	Apolonio López Ciudad.
Vicesecretario...	José Rodríguez de Silva.
Octava.—HISTORIA Y BIBLIOGRAFÍA	
Presidente...	Rafael Roldán Guerrero.
Vicepresidente...	Francisco J. Blanco Juste.
Secretario...	Santiago Aparicio Llorente.
Vicesecretario...	María Josefina Bayle.
Décima.—FARMACÓPEAS	
Presidente...	Celso Revert Cuillas.
Vicepresidente...	Luis Blas Álvarez.
Secretario...	Luis Palacios M. Pelletier.
Vicesecretario...	Eduardo Tirado.
COMISIONES PERMANENTES	
DE ADMISIONES	
Presidente...	El Secretario general.
Vicepresidente...	Emilio Alcobilla.
Secretario...	Basilio Colmenero.
Vicesecretario...	Manuel Sama.
Vocales...	Ascensión Vidal.
ECONOMICA	
Presidente...	El Interventor.
Vicepresidente...	José Delgado Llorente.
Secretario...	Antonio Fianarro.
Vicesecretario...	Wenceslao Carredano.
Vocales...	Concepción Martín de Antonio Jacinto Martínez.

Composición de la Junta de gobierno, secciones y comisiones permanentes vigentes para el año 1932. Anales de la Academia Nacional de Farmacia. (1932), 1(2): [contraportada]. 31/06/1932.





démica de número María Cascales Angosto -¡casi medio siglo!- no hubo ninguna mujer que alcanzara el máximo nivel en la Corporación y tampoco, como luego veremos, fueron muchas las elegidas como académicas correspondientes.

Sin menoscabo del aserto precedente, hay que reconocerles a las mujeres un gran mérito simplemente en tener la oportunidad de una formación igualitaria, lo cual constituía una meta difícil de alcanzar.

Si bien es cierto que el ilustrado beneditino Benito Jerónimo Feijoo abogó por la instrucción femenina, consagrando uno de los discursos más largos del primer tomo de su *Teatro Crítico Universal*, el discurso xvi, a la defensa de la mujer para “desengañar el error común respecto a la inferioridad de la mujer” (11); no cabe duda que tal ‘error’ tardaría siglos en superarse.

Estas pioneras farmacéuticas reunieron dosis incontestables de valentía y tesón, porque a la mujer, excepto individualidades, nos estuvo vedado el acceso a la enseñanza universitaria y actividades científicas hasta los finales del siglo XIX, utilizando argumentos que hoy nos parecerían ridículos y ofensivos, como la inconcebible convivencia en las aulas de hombres y mujeres, o la inferioridad intelectual de la mujer frente al varón, manifestando que “el peso específico de la sustancia gris es mayor en el hombre”, o que “el cerebro de la mujer está constituido para producir sensaciones más bien que pensamiento, circunstancia que le impide ejercer profesiones para las cuales es necesaria la fuerza intelectual” (12). Incluso Santiago Ramón y Cajal llegó a escribir que la mujer “es el cebo con que la naturaleza atrae al hombre, a fin de asegurar la permanencia de la especie” (13); o que “la mujer intelectual, es decir la joven adornada con carrera científica o literaria, constituye especie muy rara en España... abunda, por el contrario, en el extranjero...” (14); opinión bastante elocuente respecto al pensamiento sobre la mujer de muchos intelectuales de comienzos del siglo XX; algo que, aunque no se justifique, es culturalmente comprensible, porque la realidad era la desigualdad entre ambos sexos, fue -y a veces sigue siendo- grande.

Por referirnos a los accesos de la mujer a los estudios de Farmacia, la presencia femenina en las aulas, en el primer cuarto del siglo XX, era insignificante; sirva de ejemplo que, en el decenio de 1900 a 1909, tan solo se licenciaron en la Universidad Central tres mujeres, aumentaron a nueve entre los años de 1918 a 1923 (15). Es tras los años de la Guerra Civil cuando se produce un avance significativo de la presencia de la mujer en las aulas de las Facultades de Farmacia de las universidades españolas; a partir del curso 1945/46 la mayoría de los discentes son mujeres (16), tendencia que se sigue manteniendo en la actualidad.

Veamos los méritos académicos, científicos y/o profesionales de estas pioneras académicas (17).

## 2.1. Josefina Bayle Comas

Natural de Casas del Monte, una localidad cacereña, cercana a Plasencia; vio la luz el 21 de abril de 1908. Se trasladó a Madrid para estudiar en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central, ubicada en la que hoy es sede de la Real Academia Nacional de Farmacia. Durante el periodo de licenciatura obtuvo dos sobresalientes y una matrícula de honor. El título de Licenciada en Farmacia le fue expedido el 22 de marzo de 1930 (18).

Su actividad profesional la inicia como “Ayudante gratuito de clases prácticas de Historia de la Farmacia”, cuyo catedrático era Rafael Folch Andreu, durante el curso 1931-1932 (19), al tiempo que es nombrada regente de una farmacia, durante unos meses, entre enero y julio de 1931, en Argamasilla de Calatrava (Ciudad Real).

Es admitida, el 31 de marzo de 1932, en la Academia Española de Farmacia; tal vez su valedor fue Rafael Folch; desde 1932 hasta 1936 perteneció como académica de número, desempeñando el cargo de vicesecretaria de la sección de Historia y Bibliografía.

Pocos meses después, el 5 de julio de 1932, se integra en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, le corresponde el número de colegiado 960 (20) y pasó a ejercer, con botica abierta, en la localidad madrileña de Pozuelo de Alarcón (20). Continuó su formación realizando un par de cursillos, de seis meses de duración cada uno, en el Instituto Nacional de Higiene en Madrid y en el Hospital Provincial de Madrid.

El 29 de noviembre de 1936 su farmacia, como tantas otras, fue saqueada por las tropas; no volvió a ejercer en Madrid.

En 22 de junio de 1939 presenta una declaración jurada en la que manifiesta que, aunque siempre fue partidaria de una ‘política de orden’, no perteneció a ningún partido político, no se



María Josefina Bayle ARANF, s/c

80

**ACADEMIA NACIONAL  
DE  
FARMACIA**

**DECLARACIÓN JURADA**

D.ña María Josefina Bayle Comas, edad años, residencia Montevideo,  
provincia , domicilio Barrio Sur, teléfono ,  
cargo profesional actual ninguna,  
o de otra naturaleza .

¿Desea seguir perteneciendo a la Corporación? Si.

En caso afirmativo, sirvase contestar al siguiente cuestionario:

1º Ideología política anterior al 18 de julio de 1936 Ha sido siempre partidaria de una patria libre y soberana que no pertenece a ningún partido.

2º ¿Estaba en la zona nacional al estallar el Movimiento? No.

3º ¿Ha permanecido en ella hasta el fin de la guerra?

4º Cargos profesionales y políticos que en ella ha desempeñado

5º ¿Se encontraba en zona roja al producirse el Glorioso Alzamiento Nacional?, ¿pudo trasladarse a la zona liberada? Sí. Se fue después a zona blanca, pero antes de volver al ejército se dedicó un tiempo a cuidar vides establecidas por los hijos de allí.

6º ¿Prestó adhesión al Gobierno marxista o a alguno de sus autónomos, después del 18 de julio de 1936, espontáneamente o coaccionado? No me permite a continuación ni siquiera escribir mi momento a raíz del fin de mi formación para dar fe acerca de lo ocurrido.

7º ¿Ingresó en algún partido o sindicato después del 18 de julio de 1936? En caso afirmativo, ¿desempeñó algún cargo de dirección o confianza? No ingresé a más de que en varios momentos fui miembro de la CNT, adherida a la independencia.

8º ¿Contribuyó a suscripciones, donativos, etc., destinados a combatir el triunfo del Movimiento Nacional? No.

9º ¿Pertenece a la masonería? No.

10º Cargos profesionales que ha desempeñado durante el periodo de la dominación marxista La parte del 2º de noviembre del 1936 en que pudo la farmacia no le permitía hacer nada sino que estaba cerrada.

11º ¿Ha pertenecido al Ejército rojo? ¿En qué cargo? ¿Voluntario, obligado? No.

Declaración jurada de María Josefina Bayle. Madrid, 22/06/1939. (ARANF, 187/2).

encontraba en 'zona nacional' al estallar la guerra y no pudo pasar a esta porque, antes de la entrada de las tropas franquistas, fue obligada a abandonar Pozuelo de Alarcón, donde tenía su farmacia, la cual fue saqueada por las tropas de Francisco Galán el 29 de noviembre de 1936. No la obligaron, ni quiso adherirse, al 'Gobierno marxista'; nunca perteneció al 'Ejército rojo' y, aun cuando recibió en varias ocasiones impresos de la CNT para que se adheriera, no lo hizo (21).

Las dos personas de solvencia a las que señala como garantes de su actuación durante el periodo de la 'dominación marxista' son Andrés Arroyo, médico de Pozuelo de Alarcón, y Francisco Sierra, maestro nacional de Besianler (Alicante). Entre los asesinados y fallecidos durante la contienda cita al "Compañero de Pozuelo Dr. Narciso Jimeno Bayón", el cual se ausentó del pueblo y, al no volver a saber nada de él, supone ha sido asesinado. Al final constan

las firmas de José Casares Gil, Rafael Roldán y Wenceslao Carredano bajo la frase, de puño y letra de cada uno, de "Adicta a la Causa" (21).

Tras la contienda regresó a Plasencia y allí, en el Instituto de Segunda Enseñanza 'Gabriel y Galán', impartió docencia en la Cátedra de Físico-Química durante el curso 1941/42, al año siguiente pasará a ejercer como maestra de primera enseñanza del grupo escolar 'Ramón y Cajal', ocupándose de la realización de "ensayos de psicología-pedagógica" (22).

En 1944 obtiene, por concurso de méritos, la vacante de Inspector Farmacéutico Municipal de Cabezuela del Valle (Cáceres), que conllevaba la de analista en la 'Obra Sindical 18 de julio'.

Josefina Bayle causó baja voluntaria en la Real Academia de Farmacia, a solicitud propia, el 20 de enero de 1944, la formuló desde Plasencia.





Mercedes Jurado Esteban. Ficha de colegiada. ACOF-M, 387/9

## 2.2. Mercedes Jurado Esteban

Natural de Atienza (Guadalajara), vino al mundo en el noviembre de 1898. Licenciada en Farmacia por la Universidad de Madrid; su primera actividad profesional fue como regente de la farmacia de la viuda de Sanz, en Cogolludo (Guadalajara) (23). En los inicios de 1922 se trasladó a Madrid; se inscribió en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid el 14 de enero de 1922, se le asignó el número de colegiada 421 (23). Su oficina de farmacia, de la que era propietaria, estuvo ubicada en Madrid, calle Luisa Fernanda 15 [17]; la abandonó en noviembre de 1936 porque "fue destruida por una bomba de aviación..." (23).

Académica numeraria fundadora de la Academia Nacional de Farmacia, había sido admitida en el Real Colegio de Farmacia de Madrid el 21 de junio de 1922 (24). Participó el nacimiento de la empresa de distribución farmacéutica COFARES. Falleció en Madrid, en 1979.

## 2.3. Concepción Martín de Antonio

Pocos datos conocemos de esta farmacéutica, además, de que ejercía su actividad profesional en la farmacia de la madrileña calle Colón 6, de la que era propietaria su hermana Rosa María, y en la cual todas las empleadas eran mujeres (25), algo especialmente 'raro', y así lo comenta en una entrevista concedida a la periodista Josefina Carabias: "Chocaba mucho en Madrid ver una farmacia dirigida por dos mujeres. La gente venía aquí y preguntaba por el boticario, salía yo y se sorprendía muchísimo [...] De esto hace doce años [1920], hoy [1932] se han acostumbrado...", incluso el titular del artículo era significativo: "¿Llegarán las mujeres a monopolizar la carrera de Farmacia?" (26), la tendencia ya era clara.

Defensora, como su hermana, de los ideales republicanos; fue miembro directivo de la Juventud Femenina Radical-Socialista.

Fue admitida, en el Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid, el 21 de junio de 1927; académica numeraria fundadora de la Academia Nacional de Farmacia, desempeñó en ella el cargo de miembro de la comisión permanente económica, al menos en 1932/33 (3).

## 2.4. Rosa María Martín de Antonio

Nacida en Guadalajara, hacia 1891; licenciada en Farmacia por la Universidad Central en 1916, cursó con anterioridad los estudios de Magisterio. Se inscribió en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid en 1918, fue la segunda mujer colegiada, tuvo el número 234.

Propietaria, en Madrid, de la oficina de farmacia sita en Colón 6, ejerció en ella desde 1917 a 1939; tuvo laboratorio anejo, posiblemente desde 1928. El 21 de junio de 1922 fue admitida en el Real Colegio de Farmacia de Madrid; en 1932 se convirtió en académica numeraria fundadora de la Academia Nacional de Farmacia; perteneció a esta Corporación hasta 1936.

Firme defensora de las ideas republicanas, perteneció a la Junta directiva de la Juventud Universitaria Femenina, asociación de intelectuales activistas que demandaban la igualdad de género, de ella fue contadora en 1922.

En 1933 la Junta Consultiva de la Beneficencia del Ayuntamiento de Madrid la nombró Jefa Farmacéutica del distrito del Hospicio (25).

Fue la primera mujer en pertenecer a la Junta de gobierno del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid; se integró en ella en julio de 1936, tras ser incautado el Colegio por un Comité del Frente Popular compuesto por farmacéuticos. Por esas mismas fechas se procedió a la incautación de la Academia Nacional de Farmacia; se estima que en ello tuvo un papel primordial la académica Rosa María Martín de Antonio. Tras la contienda se exilió en Venezuela.



Rosa Martín de Antonio y Conchita Martín de Antonio entrevistadas por Josefina Carabias. Estampa, 5(227): 7. Madrid, 14/05/1932



## 2.5. Ascensión Mas-Guindal Calderero

Nacida en Madrid, en el verano de 1904 (22/06); hija del farmacéutico militar Joaquín Mas-Guindal, cursó los estudios de la Licenciatura en Farmacia en la Universidad Central, obtuvo el título de licenciada en julio de 1928, con premio extraordinario de licenciatura.

El 21 de noviembre de 1929 fue admitida en el Real Colegio de Farmacia de Madrid, consta como domiciliada en la calle Hortaleza 61; desde su fundación fue académica numeraria de la Academia Nacional de Farmacia, hasta junio de 1936, en que pasó a académica correspondiente; no solicitó el paso a académica de número.

Firmó su declaración jurada el 18 de julio de 1939; en ella manifiesta que vive en Madrid, en la calle Hortaleza 61, que su ideología antes del 18 de julio de 1936 era de 'derechas', que no se encontraba en 'zona nacional' al estallar la guerra y que no pudo pasarse a ella, pero no prestó adhesión al 'Gobierno marxista' aunque, en agosto de 1938, ingreso en el Sindicato de Farmacéuticos de la UGT en el que no desempeñó cargo alguno, ni contribuyó con suscripciones o donativos para combatir el triunfo de las tropas franquistas. Durante los años de la guerra fue farmacéutica regente de la Farmacia 'El Globo', cargo que desempeñaba desde 1935.



Ascensión Mas-Guindal Calderero. Fotografía de Amer. 21/09/1931. ARANF, 14.453

Perteneció al Socorro Blanco a fin de colaborar al triunfo del 'Movimiento Liberador de España'. En su expediente no señala a ningún académico marxista o que colaborar con ellos. Como personas de solvencia que pudieran avalarla remite a Toribio Zúñiga, Secretario general de la Academia Nacional de Farmacia, y a su padre, Joaquín Mas-Guindal. Al final de su declaración, como en otros expedientes, y bajo el lema "Adicta a la Causa", constan las firmas de José Casares Gil, Wenceslao Carredano y Rafael Roldán.

Durante los primeros años del Franquismo continuó ejerciendo como regente de la Farmacia 'El Globo'; en 1941 se inscribió en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, tuvo el número de colegiado 1.333 (27).

Desarrolló una intensa actividad como colaboradora en diferentes revistas profesionales: *Farmacia Nueva*, *Boletín Informativo del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos*, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, *Boletín de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia*, etc.; publicó algunas monografías en colaboración con su padre, entre ellas *Las plantas oleaginosas y Plantas productoras de esencias, resinas y derivados*.

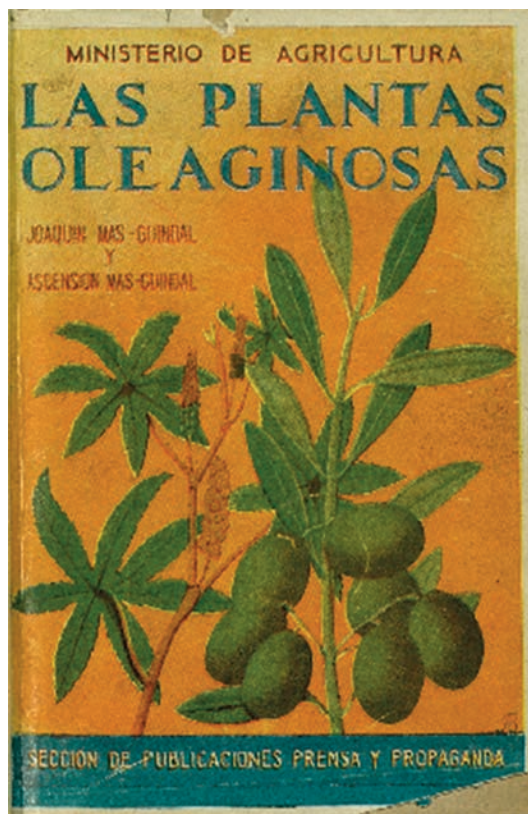
Tuvo un interés especial hacia el estudio de la cosmética y la perfumería: en 1936 presentó a la Academia el trabajo "Los materiales farmacológicos empleados en la antigüedad en la perfumería y embellecimiento de la mujer", que leyó en la sesión pública celebrada el 8 de junio de 1936. Finalizada la Guerra Civil participó activamente en las actividades de la Sección Femenina, formando parte del equipo editorial de la revista y *Revista para la Mujer*, en la que dirigió un consultorio sobre higiene y belleza.

Ascensión Mas-Guindal desempeñó, desde la fundación de la Academia, el cargo de secretaria de la sección 3ª; Ciencias Naturales; permaneció en este puesto, al menos, hasta 1942, siendo académica correspondiente. El manto protector de su padre era evidente; no por casualidad este asumió el puesto de presidente de la referida sección, amén de vicepresidente 1º de la Junta de Gobierno, hasta su muerte, acaecida en 1945.

Fue galardonada en algunos de los certámenes científicos organizados por la Real Academia de Farmacia; entre ellos el premio *Laboratorio Chemia* (1942), por el trabajo "Datos históricos sobre los materiales farmacéuticos importados de América en el siglo XVI", o el premio *Laboratorio Fernández Canivell* (1948) por "Contribución al estudio de las plantas narcóticas alucinadoras y metagnomígenas".

Tuvo farmacia abierta en Madrid, en la calle Embajadores 122. Falleció el 15 de agosto de 1971; la Real Academia de Farmacia, a través de su secretario académico, Nazario Díaz López, expresó, el 17 de septiembre de 1971, su pésame a Antonio Mas-Guindal, hermano de la fallecida.





## 2.6. Amalia Pla Riaza

Nacida en Madrid, el 1 de noviembre de 1893; su segundo apellido fue Gandía, pero al contraer matrimonio, en 1920, con Esteban Riaza, adoptó el de este (28), y como tal figura en la relación de académicos fundadores de la Academia Nacional de Farmacia y en la declaración jurada que realizó en 1939.

Finalizó los estudios de Farmacia en la Universidad Central en 1917. Se inscribió en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid el 14 de julio de 1921, tuvo el número de colegiado 400, e inició su actividad profesional como propietaria titular de la oficina de farmacia ubicada en la calle Lagasca 116; más tarde se trasladó al Paseo de Extremadura 92.

Fue admitida, en el Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid, el 21 de junio de 1922, estaba domiciliada en Madrid, Diego de León 9; tuvo la consideración de académica numeraria fundadora de la Academia Nacional de Farmacia, hasta su paso a correspondiente en junio de 1936.

En julio de 1936 se hizo cargo de la farmacia de la viuda de Marín, ocupándose, un mes después, de la regencia de esta farmacia. En 1937 trabajó en la farmacia de los herederos de Cespedosa. Estuvo afiliada a la CNT; de hecho, la farmacia de Lagasca 116, en la que figura como propietaria, había sido incautada por la Asociación de Auxiliares de Farmacia.

En su declaración jurada, firmada en 1939, señala que nunca perteneció a ningún partido político, que no se encontraba

en la 'zona nacional' al estallar la guerra y que, a pesar de intentarlo, no pudo pasarse a la 'zona liberada'; no desempeñó ningún cargo político o de representación profesional, aunque sí estuvo afiliada a la CNT. Nunca perteneció al 'Ejército rojo' y, al ser preguntada por los posibles académicos destacados por su 'significación marxista', responde que "por mi vida de aislamiento desconozco la actuación de mis compañeros". Como personas de solvencia que avalaran su actividad durante el período bélico menciona a Marcelino Riasa Díaz, Jefe de la Bandera de Falange, domiciliado en Alcalá 161, y al farmacéutico Alfonso Cespedosa; entre los fallecidos o asesinados durante la contienda cita a Andrés Marín, farmacéutico en la calle Lagasca 126.

Los responsables del proceso de 'depuración' académica pidieron, en este caso concreto, un informe sobre las actividades políticas de Amalia Pla, antes y después del 18 de julio de 1936; lo emitió el Jefe provincial del Servicio de Investigación de Falange Española Tradicionalista y de las J.O.N.S de Madrid, quien lo remitió el 16 de agosto de 1939, tal vez por la implicación política de su esposo. En dos documentos aparece su nombre como 'pendiente de revisión' junto a otros académicos correspondientes, como Vicente Brull y Ausina y Gonzalo Cruz García, de Madrid, o Cándido Rodríguez Mata, de León (21). Tal vez su situación no era buena y, 'obligada por las circunstancias', Amalia Pla causa baja en la Real Academia poco después.



Amalia Pla Gandía. Ficha de colegiada. ACOF-M, 456/16

## 2.7. María Lourdes Sánchez Soto

Natural de Madrid; cursó los estudios de la Licenciatura en Farmacia en la Universidad Central, los cuales finalizó en 1928. Se integró en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid el 27 de febrero de 1930, le fue asignado el número de colegiado 794 (29).

Inicialmente tuvo oficina de farmacia, con laboratorio anejo, en Fuentidueña del Tajo (Madrid), cuya apertura solicitó en 1932. Pudiera ser académica porque su nombre, aunque no figura en el listado elaborado en 1933, si se hace constar, con domicilio en Madrid, San Bernardino 1, en un folio mecanografiado adjunto a los Estatutos de 1932 (7).

Tras los años de la guerra, en 1941, se había trasladado a Madrid; fue propietaria de la oficina de farmacia sita en Francos Rodríguez 86.



María Lourdes Sánchez Soto. Orla de la promoción 1928 de la Licenciatura en Farmacia de la Universidad de Madrid. Colección particular

## 2.8. Petra Ascensión Vidal Piazuero

Nacida en Puebla de Híjar (Teruel), en la primavera de 1901 (13/05) (30); verificó los dos ejercicios del grado de Bachiller el 10 de junio de 1914, en Madrid, en el Instituto 'Cardenal Cisneros', obtuvo en ellos la calificación de sobresaliente; el título correspondiente le fue expedido, el 9 de agosto de 1916, por el Rector de la Universidad de Madrid (31).

Se matriculó en la Universidad de Santiago, en la Facultad de Farmacia, para realizar las materias exigibles para el ingreso, superando en el curso 1915-1916, con la calificación de aprobado, las materias de Química general, Mineralogía y Botánica y Zoología; suspendió la Física general. En septiembre de 1916 (30/09) se matricula de la asignatura pendiente en la Universidad Central; superada esta materia, inicia los estudios específicos correspondientes a la Licenciatura de Farmacia, finalizándolos, con 19 años, el 26 de julio de 1920; el título le fue expedido, por el Ministro de Instrucción Pública y Bellas Artes, el 29 de julio del mismo año (31).

En la orla de la promoción del año 1920, a la que ella pertenecía, solo figuran seis mujeres; en ella se encuentra Adrián Ayala Plaza, mi suegro, que me contó algunas anécdotas, mostrándome los *Farmacogramas*, realizados en junio de 1948, como homenaje a su promoción, por Manuel Jiménez, con dibujos de L. Tinao (32), quien dedica estos versos a Ascensión Vidal: "ASCENSIÓN VIDAL y tal / sé si es bueno o malo / que los fármacos dispensen, / en la calle Eloy Gonzalo. / Y como López Muñoz / yo tengo un surtido atroz, / más quiero que se me crea / que sé la Farmacopea. / Y "colorín coloreando..." / porque aquesta semblanza / se va acabando".

Realizó su tesis doctoral bajo la dirección de José Casares Gil; llevó por título "Análisis capilar sobre los medicamentos galénicos"; la finalizó en el curso 1921/22 (31). Trabajó sobre coloides con José Ranedo Sánchez y el Dr. Ostwall (33); y sobre fenoles con el Dr. Aguyó, entre 1927 y 1930, en la Escuela de Ingenieros Industriales de Madrid.

El 24 de septiembre de 1920 se integró en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, le correspondió el número 365. Un par de años después, el 4 de mayo de 1922, fue admitida en el Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid; en 1932 pasó a ser académica fundadora de la Academia Nacional de Farmacia, desempeñando, entre 1932 y 1933, el cargo de vocal de la comisión de admisiones.

En la década de 1930 ejerció como garante de los Laboratorios Glaxo "de Inglaterra", y era propietaria de una oficina de farmacia en Madrid, Eloy Gonzalo 27, que: "durante la dominación roja fue incautada por la UGT (auxiliares de Farmacia)" y luego intervenida por el Estado. Durante los años de la contienda vivió en Ceuta, junto a su marido; ella dejó un regente de su confianza que



Petra-Ascensión Vidal Piazuero. Ficha de colegiada. ACOF-M, 265/3.

fue desposeído del puesto cuando la UGT se hizo cargo del local, la central sindical puso al frente a dos farmacéuticos de su confianza: primero a Daniel Abad y, luego, a Amalia Iniesta (21). Finalizada la guerra, Petra Vidal regresó a Madrid, ejerciendo de nuevo en la oficina de farmacia de la calle Eloy Gonzalo 27.

Realizó su declaración jurada el 21 de julio de 1939; en ella afirma que ejerce como farmacéutica en Madrid, calle Eloy Gonzalo 21; de ideología política 'De Orden'; pasó la Guerra Civil en Ceuta, con su marido, médico militar "afecto al Glorioso Movimiento"; no desempeñó ningún cargo político, ni prestó adhesión al 'Gobierno Marxista', estuvo afiliada a la Falange y, para contribuir al triunfo, del 'Movimiento Liberador de España' hacía "labores de punto y ropa para el Frente y Hospitales" (21). Consignó, además, que a su hermano Pedro, farmacéutico establecido en Alcázar de San Juan (Ciudad Real), de tan solo 26 años, fue asesinado en julio de 1936. Al pie de su declaración quedó anotado "Readmitida en Junta de Gobierno del 30 de octubre de 1939", firmado por Toribio Zúñiga, secretario perpetuo.

Fue fundadora de la empresa COFARES y, entre 1957 y 1962, entregó a la Real Academia de Farmacia algunas de sus pertenencias (34). Según su testimonio, era la única doctora entre las académicas fundadoras de la Academia Nacional de Farmacia. La Real Academia Nacional de Farmacia le concedió su máxima distinción, la 'Medalla Carracido', en su categoría de bronce, en 1985. Estuvo casada con el coronel médico Nicomedes Sánchez Esteban. Falleció, en Madrid, el 22 de noviembre de 1989.



Dibujo de L. Tíno [c. 1948] (32)

### 3. EL INGRESO DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA EN EL INSTITUTO DE ESPAÑA Y LOS ESTATUTOS DE 1947

Desde 1946, mediante un decreto firmado por José Ibáñez Martín, Ministro de Educación Nacional, la Academia Nacional de Farmacia quedó incorporada al Instituto de España. Con fecha de 9 de agosto de 1946 se aprueba una nueva ordenación de la Real Academia de Farmacia (BOE 26/09/1946) y, pocos meses después, los nuevos Estatutos (Decreto 07/02/1947) y un nuevo Reglamento (Orden 08/04/1947). Me referiré a algún aspecto de esta normativa.

En el capítulo primero, dedicado al "Carácter y fines de la Academia", se establece: "La Real Academia de Farmacia como Corporación científica del Estado y Cuerpo consultivo al servicio de la Nación, tendrá los siguientes cometidos primordiales: la investigación y estudio de las ciencias farmacéuticas y sus afines, el fomento de su cultivo y el asesoramiento, cuando ellos lo soliciten, a los organismos oficiales". El segundo capítulo queda dedicado a la "Constitución y organización"; entre las 'clases de académicos' se establece un número clausus: la Real Academia de Farmacia queda constituida por cuarenta académicos de número, cultivadores de la Farmacia o de ciencias afines; por académicos correspondientes nacionales o extranjeros y por académicos de honor extranjeros.

Para los académicos de número era exigible ser licenciado o doctor en Farmacia o en alguna ciencia afín, haberse distinguido en la investigación y estudio de las ciencias que integran la Farma-





cia, debiendo observar “una conducta pública digna y moral, de acuerdo con el prestigio de la Academia y el honor del cargo”. Los correspondientes podrían ser españoles o extranjeros, autores de trabajos científicos relacionados con los fines de la Real Academia, si bien “no podrá pasar [su número] del duplo de los numerarios”, no contándose los adscritos a las secciones de la Academia establecidos fuera de Madrid.

#### 4. LAS ACADÉMICAS CORRESPONDIENTES EN LA AUTARQUÍA

El *Anuario de la Real Academia de Farmacia*, correspondiente a 1948, el primer número que se publica bajo el amparo del Instituto de España, solamente incluye a dos académicas correspondientes: Petra Ascensión Vidal Piazuelo y Ascensión Mas-Guindal Calderero. Hasta 1987 no fue nombrada ninguna mujer como académica de número, las pocas que pasaron a integrarse en la Real Academia durante los años de la Dictadura lo fueron como académicas correspondientes.

No lo tuvieron fácil en un marco de post-guerra en que fueron muchos los problemas, de todo tipo, que hubieron de superarse en una España arruinada. La Universidad no fue ajena a esta situación; el Régimen quiso controlar la educación a todos los niveles y, entre ellos, el universitario: reformas, cambios de planes de estudios nombramientos de nuevos catedráticos, etc., fueron realizados a tal fin.

En la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, la tendencia iniciada en el período prebélico se mantuvo al alza: las discentes comenzaron a superar a los varones, como en la actualidad; no así las docentes, que eran más bien pocas, y no llegaban a desempeñar cargos de relevancia en un universo de hombres catedráticos, profesores de investigación, académicos de número de las Reales Academias, etc. Las profesoras limitaban su actuación profesional a los roles de auxiliares de cátedra, ayudantes o adjuntos; la primera catedrática de la Facultad de Farmacia de Madrid, Rosario García Olmedo, lo fue por concurso oposición en 1979 (16).

Durante los primeros años del CSIC (1939-1954), la presencia de la mujer en muchos campos de investigación era casi anecdótica; los nuevos espacios de investigación quedaron reservados a “las élites que tuvieron a su favor ser de las generaciones formadas en el ambiente liberal de los años 30, pertenecer a la clase dirigente, y estar en el momento justo en el sitio apropiado” (37). En este contexto, las investigadoras farmacéuticas, tal vez, fueron una excepción al ser mucho el peso de la Facultad de Farmacia de Madrid en la primera etapa del Consejo, tanto por el empeño -y la fuerza política- de José María Albareda, a la vez catedrático en la Facultad de Farmacia madrileña y Secretario general del CSIC (38), y por la figura de Ángel Santos Ruiz, también catedrático de esta misma Fa-

cultad e investigador especialmente activo en el área Bioquímica, bajo cuya tutela se formaron científicas tan destacados como M<sup>a</sup> Dolores Stamm, Carmen García del Amo, Gertrudis de la Fuente, Isabel García Acha, Ana María Galarza Basanta y María Cascales Angosto que, cuando aún no era habitual, salieron al extranjero para especializarse en aspectos inéditos en nuestro país.

Estas mujeres tuvieron que sortear valladares y, con mucho esfuerzo y trabajo, alcanzaron un puesto en el campo de la investigación, si bien no adquirieron cargos de responsabilidad hasta los inicios de la década de 1970; lo cual no resta un ápice a la importante labor por ellas desempeñadas, que contribuyó a la ‘normalización’ de la situación de la mujer universitaria en España (40). *Haciendo camino al andar*, parafraseando a Antonio Machado.

Durante los años posteriores a la Guerra Civil, y hasta el final del Franquismo, ingresaron en la Real Academia de Farmacia cuatro mujeres: María Dolores Stamm Menéndez (1951), Gertrudis de la Fuente Sánchez (1955), Carmen García del Amo (1965) y Ana María Galarza Basanta (1971).

Todas estas mujeres salieron al extranjero en un periodo en el que el Régimen apenas consideraba a las mujeres investigadoras; todas desarrollaron su carrera científica con la ayuda de un gran maestro, Ángel Santos Ruiz, de cuya mano ingresaron en la Real Academia de Farmacia.

##### 4.1. María Dolores Stamm Menéndez

Nacida en Madrid, en el 04/06/1924; cursó los estudios de la Licenciatura de Farmacia en la Universidad de Madrid, con buenas calificaciones: seis sobresalientes y cuatro matrículas de honor; el título de licenciada le fue expedido el 13 de marzo de 1948, con premio extraordinario de licenciatura (41).



María Dolores Stamm Menéndez. ARANF, s/c

En 1946 ingresó en el Cuerpo de Inspectores Farmacéuticos Municipales. De 1947 a 1959 desempeñó el puesto de ayudante de clases prácticas de la asignatura 'Bioquímica Dinámica' en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid. Entre 1947 y 1949 fue becaria del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Realizó su tesis doctoral, bajo la dirección de Ángel Santos Ruiz, sobre "El metabolismo de los aminoácidos aromáticos y del triptófano en el *Bonbyx mori* L.", calificada con sobresaliente y a la que se le concedió premio extraordinario.

Su solicitud de incorporación, como académica correspondiente, a la Real Academia de Farmacia queda firmada el 1 de julio de 1950; figura avalada por Miguel Comenge, Ángel Santos Ruiz y Salvador Rivas Goday, quienes declaran conocerla y la avalan como "Profesor [sic] digno de ser admitida"; de acuerdo con lo preceptuado, presentó, como trabajo inédito y original, el titulado: "Metabolismo de insectos". El 17 de noviembre se reunió la comisión de admisiones que emite el correspondiente informe: "no encuentra nada que oponer al nombramiento del interesado [sic] como Académico Correspondiente", lo firma el Secretario General, Toribio Zúñiga; el presidente de la sección 2ª, Bioquímica, Ángel Santos, emitió el informe preceptivo en el que: "Examinado el trabajo que presenta la Srta. María Dolores Stamm, la Sección lo encuentra digno de que su autora figure en la clase de Académico Correspondiente". El plázet de la Academia es comunicado a la interesada por oficio, de 20/10/1950, firmado por Toribio Zúñiga. María Dolores Stamm tomó posesión de su plaza el 16 de febrero de 1951.

María Dolores Stamm fue miembro de la Sociedad Española de Física y Química; en 1951, mediante oposición, accedió a una plaza de colaborador científico del CSIC.

#### 4.2. Gertrudis de la Fuente Sánchez

Nacida en Madrid, en 1921. Licenciada en Ciencias Químicas (1948) por la Universidad de Madrid; en 1951 ingresó, como becaria, en el Instituto de Fisiología y Bioquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. En 1955 se doctoró en Ciencias Químicas; su tesis doctoral, dirigida por Ángel Santos Ruiz, llevó por título "Estudio de la carboxilasa pirúvica".

Tras obtener el grado de doctora pasó a trabajar en el Departamento de Fisiología, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Madrid, en el laboratorio de Enzimología dirigido por Alberto Sols. Junto a este equipo se trasladó, en 1956, al Centro de Investigaciones Biológicas, dirigido por Gregorio Marañón.

En 1957 obtuvo plaza de colaborador científico del CSIC; sus investigaciones se centraron en la caracterización, identificación y función de las enzimas del metabolismo de los hidratos de carbono y su interrelación con las patologías clínicas.



Gertrudis de la Fuente Sánchez. Colección Zeta Films / Comunidad de Madrid.

Formó parte, en 1963, del grupo fundador de la Sociedad Española de Bioquímica, entidad de la que fue secretaria entre 1970 y 1974; promovió activamente el VI Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica, del que fue presidenta, celebrado en Madrid, en 1969.

Al establecerse, en 1970, en el CSIC, las plazas de profesor de investigación, Gertrudis de la Fuente fue promovida a dicho nivel siendo una de las primeras mujeres en alcanzarlo.

Desempeñó un papel relevante durante la respuesta al envenenamiento masivo de personas afectadas por el denominado "síndrome tóxico", enorme problema de salud pública. Ella coordinó, desde el CSIC, a petición de la comisión clínica gestada al efecto, la investigación básica; fue nombrada, por la Organización Mundial de la Salud, vocal de la comisión específica permanente creada a tal fin.

En 1979 se trasladó, junto al resto del personal que integraba el Instituto de Enzimología y Patología Molecular (CSIC), a un nuevo edificio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), haciéndose cargo dicho Instituto de la docencia de la materia de 'Bioquímica' en dicha Facultad, por lo que fue nombrada catedrática *ad honorem*; mantuvo esta actividad incluso después de su jubilación administrativa, acaecida en 1981. Fue miembro del Panel de Expertos en Enzimología de la Sociedad Española de Química Clínica y miembro del Consejo Nacional de Prevención de la Subnormalidad. Falleció en Madrid, el 23 de enero de 2017 (43).

La relación de Gertrudis de la Fuente con la Real Academia de Farmacia se inicia en 1955; ese año, tras ganar un premio en el concurso científico por el trabajo "Nuevas aportaciones al conocimiento de la carboxilasa pirúvica" (44), Toribio Zúñiga, Secretario perpetuo de la Corporación, le comunica, con fecha de 21 de noviembre de 1955:



*"La Junta de Gobierno de esta Real Academia en sesión celebrada el día 17, para adjudicar los premios del Concurso Científico de 1955, acordó, a propuesta del Jurado calificador, conceder a usted el Premio de la Academia, dividido a partes iguales con D. José M<sup>a</sup> Torres Acero Fernández su recompensa metálica, y Título de Académico correspondientes, por su trabajo cuyo lema es 'Castilla'. La entrega de este premio se hará en la sesión solemne inaugural del Curso 1955-1956, el jueves día 1<sup>o</sup> de diciembre a las siete de la tarde. Al comunicarle a usted tan honrosa noticia, le ruego asista a dicha solemnidad, para recibir el premio y tomar posesión de su plaza de miembro correspondiente de esta Real Corporación. Dios guarde a Ud. Muchos años..." (45)*

En el *Anuario de la Real Academia de Farmacia* publicado en el año 1956 figura Gertrudis de la Fuente Sánchez, con domicilio en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, como académica correspondiente desde el 17 de noviembre de 1955.

Pocos días después, el 3 de diciembre de 1955, el Académico Secretario le remite la "Ficha de Académico" para que, debidamente cumplimentada, junto a dos fotografías de tamaño aproximado de 6 x 9 cm., las remita a la Corporación, con objeto de que figure en un 'Álbum de Académicos' y en su expediente personal.

Los académicos adquirirían, por el hecho de serlo, el compromiso de la suscripción a los Anales de la Real Academia de Farmacia. Al no abonarse el correspondiente recibo por el banco en el que estaba domiciliada la suscripción, el administrador de la Real Academia le envió un 'Saluda' comunicándole el hecho, al cual ella contestó que el recibo había sido devuelto debido a que el sistema de cobro era muy incómodo pues, por su trabajo, no le era fácil desplazarse a las horas de caja y que en su domicilio no suele haber nadie que se haga cargo de los recibos. Por ello sugiere que envíen a un cobrador a su lugar de trabajo (Instituto 'Gregorio Marañón', Velázquez 138, Madrid) y, si esto no fuera posible, les solicita indiquen una dirección bancaria en la que la Academia tuviera cuenta corriente y ella daría orden para que se efectuara la correspondiente transferencia. Continúa la misiva solicitando que le den de baja en la suscripción a los Anales de la Real Academia de Farmacia, ya que esta publicación no es de su interés, porque no está dentro del ámbito de sus actividades científicas y, debido a su excesivo trabajo, apenas tiene tiempo para su lectura ni espacio en su biblioteca para guardarla; según señala, la realidad es que no tiene tiempo ni espacio para una parte de las publicaciones especializadas en temas afines a su trabajo, y en consecuencia se ve obligada a renunciar a suscripciones de revistas que no respondan a sus intereses profesionales.

La Real Academia, tras recibir esta respuesta, procede - en aplicación a la normativa al respecto- y por motivos meramente administrativos, a darla de baja como académico correspondiente

a finales de abril de 1962. Tal hecho le fue comunicado a Gertrudis de la Fuente; ella respondió, con fecha de 7 de mayo de 1962, en carta manuscrita dirigida al administrador de la Real Academia de Farmacia en la que le manifiesta que acepta la decisión de la Academia y los motivos esgrimidos: "sin que ello implique menosprecio del título sino todo lo contrario"; comprende que no está vinculada a la Farmacia, "no soy Farmacéutica", y no considera justo ocupar una plaza que, siendo limitadas, corresponde a algún otro compañero que reúna más méritos (46).

En resumen, Gertrudis de la Fuente, gran científica y pionera en muchos campos de la investigación, dejó de pertenecer a la Real Academia de Farmacia por renunciar a la suscripción de la revista de la Corporación, preceptivo entonces, tan solo siete años después de su ingreso, argumentando que no se sentía vinculada a la Farmacia, aunque -conviene recordar- que su formación inicial como investigadora, aunque licenciada y doctora en Ciencias Químicas, la hizo bajo la dirección de Ángel Santos Ruíz, en el Instituto Español de Fisiología y Bioquímica que este dirigía, ubicado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, en el cual realizó varios trabajos de investigación, que han llevado a que algunos de sus biógrafos supusieran que era 'doctora en Farmacia' (45).

Su investigación, como bioquímica, no dejaba de tener relación con patologías clínicas; ella colaboró con centros hospitalarios españoles para poner en marcha, en servicios de pediatría, diagnósticos sobre glucogénesis, intolerancia a la fructosa y galactosemia; entendemos, por tanto, que alguna relación podía hallarse entre sus colaboraciones y la investigación en fármacos capaces de paliar o curar estas y otras patologías. ¡La Farmacia no le era tan ajena!

#### 4.3. Carmen García del Amo

Nacida en Torrecilla de la Orden (Valladolid), el 11 de junio de 1905. Cursó los estudios de Bachillerato en Santander y la licenciatura de Ciencias Químicas en la Universidad de Santiago de Compostela, con buenas calificaciones: 12 sobresalientes y 4 matrículas de honor, licenciándose en 1927. Al año siguiente ingresó en el Laboratorio de Investigaciones Físicas de Madrid, asistiendo, durante el curso 1929/30, a las clases prácticas de Química Física, Electroanálisis y Electroquímica que dirigía Enrique Moles. En 1931 se integró en el Instituto Nacional de Física y Química; trabajó con Julio Guzmán, en la sección de Electroquímica que este dirigía. Docente de 'Química' en la Residencia de Señoritas; en 1933 fue nombrada profesora adjunta del Instituto de Enseñanza Media 'Cervantes', ubicado en Madrid.

En 1942 alcanzó el grado de Licenciada en Farmacia. Recibió formación especializada en la Escuela Nacional de Sanidad, donde se diplomó en Sanidad (1947) y en Bacteriología (1948); poco tiempo después, mediante oposición, obtuvo plaza de Inspector Farmacéutico Municipal (47).





En el año 1949 se inicia en la investigación como becaria adscrita al Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica (CSIC); bajo la tutela de Ángel Santos Ruiz realiza su tesis doctoral sobre el "Estudio comparativo de los métodos de hidrólisis de proteínas". Ese mismo año de 1949 es nombrada ayudante de clases prácticas de 'Bioquímica', en la Licenciatura de Farmacia, cargo que desempeña hasta 1957, siendo ya doctora en Farmacia, al tiempo que colaboradora temporal del referido Instituto.

En 1955 pasó a encargarse de dirigir la sección de Proteínas del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica (CSIC) y, en 1957, por oposición, obtuvo plaza de colaboradora científica del CSIC; a ella se debe la estructura de los laboratorios de isótopos de este centro, que quedaron bajo su dirección. Su fructífero trabajo, además de los artículos de investigación publicados, se materializó en la dirección de siete tesis doctorales, todas ellas con la máxima calificación, acreedoras de dos premios: una el extraordinario de doctorado y la otra el del Instituto de Cultura Hispánica.

Firmó, en 1963, como investigadora principal, un convenio con el Agricultural Research Service U.S.A., para trabajar sobre el "Metabolismo del Zn-65 en organismos vivos" obteniendo resultados satisfactorios, a juicio del organismo que le concedió la subvención; la bioquímica del Zinc se convirtió, a partir de ese momento, en el objeto principal de su investigación.

Su solicitud de ingreso en la Real Academia de Farmacia lleva fecha de mayo de 1964; en ella se presenta como Licenciada en Ciencias Químicas, colaborador científico del CSIC y propietaria de una oficina de farmacia establecida en Madrid; como trabajo inédito presentó el titulado "Algunos aspectos de la bioquímica del Cinc" (47); acompaña su solicitud con su currículum y una relación de sus trabajos publicados (48). La solicitud venía avalada por tres académicos de número que declararon conocer a la interesada y garantizar que era "Profesor [sic] digno para ser admitido"; el primer firmante es Ángel Santos Ruiz. Él mismo informa, meses más tarde, el 9 de febrero de 1965, sobre el trabajo presentado:

"... se trata del estudio sobre la Bioquímica del Cinc con especial referencia al isótopo pesado Zinc-65. Se recogen en esta revisión no solamente los principales trabajos realizados en el extranjero sino también los llevados a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid en el transcurso de estos últimos años en los que la Srta. García Amo ha intervenido ampliamente" (47).

La Academia, vistos los informes de la comisión de admisiones y de la sección correspondiente, acuerda, por unanimidad, el 25 de febrero de 1965, la admisión de la aspirante; en la sesión de ese mismo día, tras abonar los derechos de ingreso y la medalla, Carmen García del Amo tomó posesión como académica correspondiente de la Real Academia de Farmacia.

Asistía con mucha asiduidad a las sesiones de la Real Academia, prácticamente hasta poco antes de fallecer. Era una mujer afable, respetuosa y humilde, aún recuerdo las palabras tan elogiadas que me dirigió el día de mi toma de posesión como académica correspondiente. Falleció en Madrid, el 20 de julio de 1995.

#### 4.4. Ana María Galarza Basanta

Nacida en Bilbao (Vizcaya), en 1932; fue becada, por el Ayuntamiento de su ciudad natal, con una beca instituida por la viuda de Espalza que le permitió realizar sus estudios durante 18 años, entre 1941 y 1960 (49).

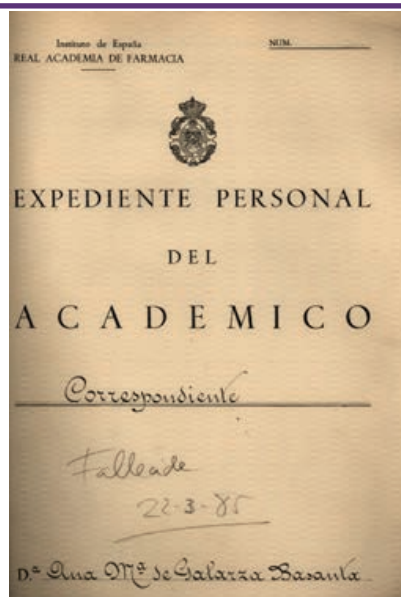
Cursó la Licenciatura en Farmacia en la Universidad de Madrid; brillante discente, obtuvo varias matrículas de honor, alcanzando el grado de Licenciada, en 1956, con la calificación de sobresaliente. Ese mismo año de 1956 inició los trabajos de investigación que, bajo la dirección de Ángel Santos Ruiz, en el Instituto Español de Fisiología y Bioquímica (CSIC), habrían de conducirla a la elaboración de su memoria doctoral; disfrutó de una beca del CSIC durante los cursos 1957 a 1960, período durante el cual realizó los cinco cursos monográficos de doctorado, todos ellos calificados con sobresaliente. Defendió su memoria doctoral en 1960, igualmente calificada con sobresaliente.

En 1958 obtuvo el título de especialista en Análisis clínicos y biológicos; ese mismo año de 1958 fue becada por el Ministerio de Asuntos Exteriores para estudiar, en la Universidad de Grenoble, Lengua y Literatura Francesa.

En el curso 1959/60 comenzó su actividad docente, como profesor ayudante de clases prácticas de la asignatura de 'Bioquímica', en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid; durante los cursos 1960/61 y 1961/62, continuó desempeñando este puesto como ayudante becario de clases prácticas, al tiempo que se le concedió una beca de la Fundación March, sección de Ciencias, para continuar sus trabajos de investigación sobre el metabolismo del zinc, utilizando Zn-65 como trazador.

Obtuvo el premio Alter en el concurso científico patrocinado por la Real Academia de Farmacia, en 1960, por su trabajo titulado "Bioquímica de los omocromos". Becaria de la Universidad de Madrid en 1963, para realizar un trabajo de investigación sobre "Disproteínas producidas por el isótopo Zn-65"; impartió clases teóricas de 'Química fisiológica' en la Facultad de Ciencias de Madrid (sección de Ciencias Biológicas), durante los cursos 1961/62 y 1962/63; este último año fue nombrada profesora adjunta provisional. Durante dos cursos, 1962/63 y 1963/64, impartirá 'Bioquímica Estática' y 'Bioquímica Dinámica' en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid.

En 1963 la Facultad de Medicina de Clermont-Ferrand (Francia) le concedió una beca para realizar un curso sobre Hidro-



Ana María Galarza Basanta. Expediente personal de académica correspondiente (ARANF)

logía. En 1964 obtuvo, por oposición, plaza de profesor adjunto de 'Bioquímica' en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid. Desde 1969 desempeñó el cargo de profesora agregada de Bioquímica de dicha Facultad y jefa del Laboratorio de Hemodinámica adscrito a la Cátedra de Bioquímica.

En esta etapa de su vida académica, Ana María Galarza solicitó, con fecha de 14 de mayo de 1970, ser admitida como académica correspondiente en la Real Academia de Farmacia, a cuyo efecto presentó un trabajo titulado "Enzimas y mecanismo de regulación en el sistema hematopoyético"; su solicitud fue avalada por José Lucas Gállego, Nazario Díaz y Ángel Santos Ruiz. Ingresó el 25 de febrero de 1971, siendo presentada por Ángel Santos Ruiz. Falleció el 22 de marzo de 1985 (49).

## 5. MARÍA CASCALES ANGOSTO, PRIMERA ACADÉMICA DE NÚMERO, TRAS LA INCORPORACIÓN DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA AL INSTITUTO DE ESPAÑA

María Cascales Angosto nació en Cartagena, el 13 de agosto de 1934; doctora en Farmacia por la Universidad de Madrid; en 1971 obtuvo, tras oposición, plaza de investigador científico del CSIC; fue directora del Departamento de Bioquímica Farmacológica y Toxicológica del Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM) y, entre 1983 y 1989, directora del Instituto de Bioquímica (CSIC).

Su solicitud de ingreso, como académica correspondiente, en la Real Academia Nacional de Farmacia, data del 28 de abril de 1977; fue avalada por Gregorio Varela, Manuel Ortega Mata y Antonio Doadrio. Junto a la solicitud de ingreso presentó el trabajo titulado "Alteraciones bioquímicas inducidas por intoxicación etílica"

y su curriculum vitae. La Junta de Gobierno, en su reunión de 7 de junio de 1977, informó favorablemente sobre la candidatura y aceptó el ingreso en la Corporación de la "citada señorita" (50). María Cascales ingresó, como académica correspondiente, el 23 de junio 1977.

María Cascales, especialista en Bioquímica clínica, desarrolló una importante carrera investigadora en España, con frecuentes estancias en el extranjero: fue becaria de la Fundación March en la Universidad de Kansas City (USA) y *Fellow* de la Royal Society de Londres, desarrolló acciones integradas con la Universidad Nottingham (Reino Unido), a través del MEC-British Council (UK) y fue investigadora principal en proyectos financiados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Norteamericanos y por entidades españolas, tanto públicas (CAYCIT, CICYT, MEC) como privadas (Alter S.A.).

Tras nueve años como académica correspondiente, fue elegida académica de número; el hecho acaeció el 21 de marzo de 1986; sucedió en la medalla número 25 a César González Gómez. A María Cascales le cupo el honor de ser la primera mujer en ocupar una plaza de número en la Real Academia de Farmacia tras el ingreso de esta Corporación en el Instituto de España. Su candidatura fue avalada por Federico Mayor Zaragoza, Antonio Doadrio López y Octavio Carpena Artés.

La sesión solemne de toma posesión tuvo lugar el 29 de enero de 1987. Su discurso de ingreso versó sobre: "Aspectos bioquímicos en hepatotoxicidad experimental"; la contestación, por parte de la Academia, correspondió a Ángel Santos Ruiz, del que María Cascales afirma en su discurso: "El Profesor Santos Ruiz, propulsor de los estudios universitarios de la bioquímica en España, Director





María Cascales Angosto. Colección personal

de esta Real Academia, ha sabido estimular nuestra iniciativa y sacar de nosotros, sus discípulos, lo mejor". A la sesión asistieron, entre otros, el premio Nobel, Severo Ochoa.

La labor de María Cascales como académica de número se ha puesto de manifiesto en sus múltiples actividades realizadas: fue representante de la Real Academia Nacional de Farmacia en la Mesa del Instituto de España y Académica Tesorera de esta Corporación. En 2002 pronunció el discurso de apertura del curso académico, versó sobre "Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas". En 2019 solicitó el paso a académica supernumeraria, sin mermar por ello su actividad científico-intelectual en la Real Academia Nacional de Farmacia. En febrero de 2021 donó a la Academia su biblioteca científica personal y su colección de fotografías y, desde 2021, financia un premio, en

el concurso científico anual convocado por la Real Academia Nacional de Farmacia, que lleva su nombre. Es 'Medalla Carracido' en su categoría de oro, la máxima distinción que otorga la Real Academia Nacional de Farmacia.

Trabajadora incansable, María Cascales es miembro correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia de Perú, de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Chile, de la Real Academia de Medicina de Murcia y de la Sociedad Química del Perú. Su ciudad natal, Cartagena, la ha nombrado 'Hija Predilecta' y le ha dedicado una vía pública en su honor. Está en posesión de la Gran Cruz de la Orden Civil Alfonso X 'el Sabio', en reconocimiento a los méritos contraídos en los campos de la ciencia, la docencia y la investigación.

Tras la entrada de María Cascales en la Real Academia de Farmacia, la incorporación de la mujer como académica de número dejó de ser algo excepcional, sin menoscabo que en número inferior al de varones. Los méritos, no su condición de mujer, las llevaron a ser elegidas para asumir dicha responsabilidad. En 2007 es electa una mujer, María Teresa Miras Portugal, para presidir la Corporación y, en 2020, fue nombrada la primera Presidenta de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia. En 2011 ingresó la primera académica numeraria por el área de ciencias afines: María Vallet Regí, química, pionera en el estudio de materiales cerámicos mesoporosos, biomateriales inteligentes y regenerativos, un referente en Biomedicina.

Todas ellas, día a día, tuvieron que vencer muchas dificultades para alcanzar puestos de máxima responsabilidad y excelencia, los cuales consiguieron gracias a su valía, tesón, esfuerzo, responsabilidad y un constante afán de superación.



Ingreso de María Cascales en la Real Academia de Farmacia. Madrid, 29/01/1987



**Tabla 1.** Académicas de número de la Real Academia Nacional de Farmacia (1946-2022)

Académica	Ingreso
María Cascales Angosto	29/01/1987
María del Carmen Francés Causapé	16/11/1995
María del Carmen Avendaño López	06/04/2000
María Teresa Miras Portugal	25/01/2001
Ana María Pascual Leone	13/12/2001
María José Alonso Fernández	17/06/2010
Rosa María Basante Pol	28/04/2011
María Vallet Regí	27/10/2011
Yolanda Barcina Angulo	16/02/2017
Mercedes Salaices Sánchez	01/06/2017
María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado	29/09/2020
María Molina Martín	21/10/2021
Ascensión Marcos Gallego	24/11/2022
Lina Badimón Maestro	Electa

## 6. EPÍLOGO

La mujer fue imposibilitada, durante siglos, a desempeñar trabajos, o realizar estudios profesionales, entonces solo reservados a los varones. Durante la primera década del siglo XX la presencia, aún minoritaria, de la mujer en la universidad española fue un gran estímulo y un logro conseguido por el tesón, esfuerzo y trabajo de las pioneras, mujeres valientes, perseverantes y con gran confianza en si mismas; evocando a madame Curie: "Hay que perseverar y sobre todo tener confianza en uno mismo".

El esfuerzo, el tesón y la valía de todas estas mujeres académicas, correspondientes y de número, por alcanzar cotas que les estaban teóricamente vetadas mereció la pena. Han sido capaces de franquear multitud de obstáculos en los distintos momentos en los que, por cuestiones político-sociales, históricas o de otra índole, les impedía llegar en igualdad con los varones. Comparto la opinión de Marie Curie: "hay que sentirse dotada para realizar alguna cosa y esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste".

## 7. REFERENCIAS

1. Puerto Sarmiento F.J. Historia de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2012, p. 69.
2. Orden ministerial de 6 de enero de 1932. Gaceta de Madrid, 09/01/1932.
3. Puerto Sarmiento, nota 1, p. 67-83.
4. Orden ministerial de 16 de junio de 1932. Gaceta de Madrid, 21/06/1932.
5. Zúñiga Sánchez-Cerrudo, T. [Memoria de Secretaría de los años

1936 a 1940, presentada en la sesión celebrada el 19 de enero de 1941. Anales de la Real Academia de Farmacia (1941), 7(1), p. 7], a quien sigue Puerto Sarmiento (nota 1, p. 106), señala que fue aprobada por orden del Ministerio de Instrucción Pública fechada en 11/06/1936.

6. Puerto Sarmiento, nota 1, p. 117-124.
7. Archivo de la Real Academia Nacional de Farmacia [ARANF], s/c, Folio mecanografiado, conservado junto a una copia de los Estatutos de la Academia Nacional de Farmacia correspondientes a 1932.
8. Cf. García Garralón M., Renau López R. Pioneras farmacéuticas. Las primeras mujeres del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid (1918-1936). Madrid: Colegio oficial de Farmacéuticos de Madrid, 2020.
9. Lo cual no significaba novedad alguna; las corporaciones o congregaciones en que se asociaron los boticarios desde el siglo XVI ya exigían una cuota de ingreso y las anualidades correspondientes.
10. El 12/10/1939 la 'Comisión calificadora', conformada tras la dimisión de la Junta provisional de depuración, publica la relación de los académicos readmitidos, al ser considerados 'con méritos suficientes' para reingresar como numerarios. Son un total de 56 miembros; entre ellos no aparece ninguna mujer (ARANF, 187/2).
11. Basante Pol R. La Farmacia. ayer y hoy. Reflexiones en torno al medicamento y sus profesionales [Discurso (...) leído en la sesión del día 28 de abril de 2011 para su ingreso como académica de número y contestación por el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento]. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2011, p. 39-40.



12. Flecha García C. Las primeras universitarias en España. Madrid: Narcea, 1996, p. 55.
13. Ramón y Cajal S. *Charlas de Café*. Madrid: Espasa Calpe, 1987, p. 243. A este respecto conviene consultar la obra Puerto Sarmiento F.J. *La mujer en la publicidad farmacéutica en la primera mitad del siglo XX*. Madrid: Instituto de Comunicación Científica, 2009, "¿Por qué se emplearon a las mujeres en la publicidad farmacéutica? Por los mismos motivos que los reclamos publicitarios. Por su capacidad de seducir. . ." (p. 12).
14. Ramón y Cajal S. *Reglas y Consejos sobre la investigación científica (Los tónicos de la voluntad)* [Discurso leído con ocasión de la recepción del autor en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales]. Madrid: Imp. y Librería de Nicolás Moya, 1920.
15. González Bueno A., Núñez Valdés J., Ramos Carrillo A. La presencia de mujeres en los estudios de Farmacia de las Universidades españolas (1913-1936). *Llull*, 45(90) (2022), 183-208. [doi-org/10.47101/llull.2022.45.90.gonzalez\_bueno]
16. Reparaz de la Serna G. Bases de datos para el estudio de la mujer en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid en la España autárquica (1938-1959) [Memoria doctoral dirigida por Rosa Basante Pol y Carlos del Castillo Rodríguez]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2015.
17. Los datos aquí incluidos son, básicamente, los que constan en la "ficha del académico" y en la "declaración jurada" de cada una de ellas; estos documentos se encuentran en el archivo histórico de la secretaría de la Real Academia Nacional de Farmacia.
18. "Expedientes personales de académicos españoles y extranjeros". ARANF, 201/1
19. La materia de Historia de la Farmacia, en el plan 'provisional' de 1931, se incluye como asignatura de doctorado con el título de "Historia de la Farmacia y estudio comparativo de Farmacopeas". Tras los años de la Guerra Civil, en el plan de estudios de 1944, gracias a los esfuerzos de Rafael Folch Andreu, pasa a cursarse, bajo el título de "Historia de la Farmacia", como asignatura obligatoria de quinto curso. (Decreto sobre ordenación de la Facultad de Farmacia, de 7 de julio de 1944. BOE, 04/08/1944).
20. García Garralón, Renau López, nota 8, p. 93.
21. ARANF, 187/2.
22. Roldán Guerrero R. *Diccionario Biográfico y Bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*. Tomo III. Madrid: INPHOE, 1975, p. 279-281.
23. García Garralón, Renau López, nota 8, p. 81, 99.
24. Puerto Sarmiento, nota 1, p. 220.
25. García Garralón, Renau López, nota 8, p. 59.
26. Carabias J. ¿Llegarán las mujeres a monopolizar la carrera de Farmacia? *Estampa*, 5(227) (1932), 7-9. [14/05/1932].
27. Archivo del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid [ACOF-M], 407/35.
28. Antonio González Bueno, comunicación personal, 04/2022.
29. García Garralón, Renau López, nota 8, p. 92-99.
30. Así consta en su 'ficha de académico' (ARANF, Académicos correspondientes fallecidos, caja 1).
31. Archivo Histórico Nacional [AHN], Universidades, 6274/5.
32. Jiménez M., Tinao L. *Farmacogramas*. Universidad Central. Facultad de Farmacia. Promoción 1920. Madrid: Imprenta Collantes & Rubio, 1948.
33. Probablemente Wilhen Ostwald, premio Nobel de Química en 1909, experto en coloides, cuya relación con José Casares Gil es conocida; según Benítez Trujillo (Estudio bibliográfico de Antonio Casares Rodríguez y José Casares Gil [memoria de licenciatura]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 1983), José Casares Gil "En la Junta del 10 de marzo [1924] expuso los resultados de sus gestiones para conseguir que el profesor Ostwald viniese a la Facultad de Farmacia, para dar un curso práctico de "Química de coloides". El profesor Ostwald le contestó afirmativamente comprometiéndose a llegar el 20 de marzo. . ." No conocemos ninguna publicación de Petra Vidal con Wilhen Ostwald, lo que no excluye que participase y trabajase con él en el curso referido.
34. Algunos libros, tal la *Pharmacopoeia* contemporánea de Thomas Fuller (1783), *Pharmacopoeia* bateana de Jorge Bateus (1776) y la *Filosofía Farmacéutica* de Gregorio Bañares (1804), además de los títulos de boticario de Francisco Asensio Goicochea, fechado el 29/07/1791 y el de doctor de Dámaso de Goicochea y Garitano, expedido en Madrid el 28/10/1943.
35. En su expediente conservado en el ARANF se guarda la esquila de Petra Vidal publicada en el diario madrileño ABC.
36. Este mismo capítulo II refiere el método procedimental, requisitos y currículo que habría de presentarse para solicitar una plaza de académico de número, tras haber sido publicada en el *Boletín Oficial del Estado*. La solicitud debería estar avalada por la firma de tres académicos de número que no podrán votar al aspirante pero si se computarán sus votos a favor del mismo. Respecto a los académicos correspondientes se requiere, para su ingreso, una solicitud personal "documentada y la firma de tres Académicos de Número; a esta instancia se acompañará un trabajo original e inédito sobre las ciencias farmacéuticas o afines. También se podrá obtener el título de Académico Correspondiente como premio en alguno de los concursos científicos que celebra la Academia". Esta situación no era nueva, ya en noviembre de 1932 se otorgó tal consideración a los ganadores de un premio en el concurso científico conmemorativo del Centenario de la Facultad de Farmacia de Madrid (Puerto Sarmiento, nota 3).
37. Ortiz Gómez T., Becerra Conde G. *Mujeres de ciencias: Mujer feminismo y ciencias naturales, experimentales y tecnológicas*. Gra-



- nada: Universidad de Granada, p. 96.
38. José María Albareda fue catedrático de Mineralogía y Zoología, luego Geología aplicada, y Secretario General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), cuyo funcionamiento ordenó, fomentó y ejecutó los primeros años de la política científica del Franquismo; el establecimiento de centros de investigación conexiónados a las diferentes cátedras universitarias favoreció la investigación y fomentó el inicio de la labor investigadora de alumnos, incluidas las mujeres, mayoritarias en la Facultad de Farmacia madrileña (Reparaz de la Serna G., Basante Pol R., González Bueno A. Ciencia y Farmacia en el franquismo: El Club Edaphos vivero de investigadores en tiempo de José María Albareda. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2016).
  39. El Instituto 'Ramón y Cajal' (CSIC) tuvo una sección dedicada a la investigación bioquímica dirigida por el catedrático de la materia homónima en la Facultad de Farmacia, Ángel Santos Ruiz. En 1947 se funda el Instituto de Bioquímica y Fisiología, del que Santos Ruiz fue director hasta 1963.
  40. Basante Pol R., Reparaz de la Serna G. El papel de la mujer en las enseñanzas de Bioquímica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid durante la autarquía en España. *Anales del Instituto de Estudios Madrileños*, 53 (2013), 349-378.
  41. ARANF, "Académicos correspondientes fallecidos", caja 1.
  42. El 28/11/1952, en cumplimiento a lo dispuesto en la normativa vigente, entregó a la biblioteca de la Real Academia de Farmacia las siguientes obras: "Sobre el metabolismo de la fenilalanina en el *Bonbyx mori* L", "Sobre el metabolismo de la tirosina y el triptófano en el *Bonbyx mori* L", publicadas ambas en septiembre de 1950, en el número 3 de la Revista Española de Fisiología; "Los aminoácidos aromáticos y el triptófano en el metabolismo del gusano de seda (*Bonbyx mori*)" publicado en los *Anales de la Sociedad Española de Física y Química*, en el volumen correspondiente a septiembre/octubre de 1950; "Metabolismo de aminoácidos cíclicos", publicado en 1950, en *Medicamenta*; "Metabolismo de insectos", en los *Anales de la Real Academia de Farmacia* aparecidos en 1950; "Acerca del mecanismo bioquímico de producción de ondas polarográficas en sueros", impreso en septiembre de 1951, en *Medicina*; y "Metabolismo de los compuestos cetógenos", publicado en 1952, en el número 68 de la revista *Medicamenta*.
  43. Santesmases M. J. Gertrudis de la Fuente Sánchez. *Real Academia de la Historia, Diccionario Biográfico electrónico* (<http://dbe.rah.es>).
  44. El trabajo fue publicado en los *Anales de la Real Academia de Farmacia* aparecidos en 1956. Fuente Sánchez G. Nuevas aportaciones al conocimiento de la carboxilasa pirúvica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 22(4) (1956), 345-372.
  45. ARANF, "Académicos correspondientes fallecidos", caja 1.
  46. Expediente personal de Gertrudis de la Fuente (ARANF, 201).
  47. Expediente personal de Carmen García del Amo (ARANF, "Expediente de Académicos correspondientes fallecidos", caja 2).
  48. Estudio sobre bioquímica de prótidos. V. Modificación del método de Mc. Carthy-Sullivan para valorar metionina. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*, 48-348. 1952; Estudio sobre bioquímica de prótidos. VI. Método de hidrólisis ácida de proteínas. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*, 48-597. 1952; Estudio sobre bioquímica de prótidos. VII. Los métodos de hidrólisis alcalina de las proteínas y su valor comparativo. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*, 48-605. 1952; Estudio sobre bioquímica de prótidos. VIII. Conservación del triptófano en los hidrolizados ácidos. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*, 50-793. 1954; Método de hidrólisis y análisis de proteidos. *Medicamenta*, 8-121. 1952; Consideraciones sobre el problema de hidrólisis ácidas de proteínas. *Acta de la II Reunión de Ciencias Fisiológicas*, 1955, 199; Aplicación del aparato de micro determinación de gases en sangre, del Dr. Monche a la valoración de aminoácidos. *Acta de la III Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas*, 1956, 81; Valoración manométrica de aminoácidos, basada en la determinación de sus grupos carboxilo. *Revista Española de Fisiología*, 13-47. 1957; Aplicación del aparato de Monche a la micro determinación de gases en sangre para la valoración de aminoácidos. *Revista Española de Fisiología*, 13-35. 1957; Estudio sobre Bioquímica de prótidos. IX. Conservación del triptófano en presencia de agentes reductores; empleo del SO<sub>2</sub> en la hidrólisis ácida. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*, 52-237. 1957; Contribución al estudio del aprovechamiento dietético de los animales de matadero. *Anales de Bromatología*, 9-251. 1957; Contribución a l'étude d'un hydrolysat 'Excellent' de proteines. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, 40-527. 1958; Estudio de un plasma animal desanafilactizado por método físico original. I.- Estudio electroforético. *Acta III Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas*, 1958, 17; Estudio de un plasma animal desanafilactizado por método físico original. II.- Grupos carboxilos libres. *Acta III Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas*, 1958, 21; Estudio de hidrólisis de proteínas. El uso de SO<sub>2</sub> en la protección de los aminoácidos durante la hidrólisis de proteínas en presencia de carbohidratos. *Revista Española de Fisiología*, 16(supl. 3), 1960, 73; Evaluación del azufre y oligoelementos en el cabello humano. II Asamblea Nacional de Farmacéuticos Analistas Clínicos, 1960; Sobrevaloración del Zn-65 en materiales biológicos. II Asamblea Nacional de Farmacéuticos Analistas Clínicos, 1960; Datos bioquímicos sobre hidrolizados





- de proteidos de interés farmacéutico. Acta de la Reunión de Farmacéuticos Latinos [Marsella], 1960; Contribución al estudio bioquímico del cabello humano. I Oligoelementos. Actas de la V Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas [Madrid], 1959; Contribución al estudio bioquímico del cabello humano. II Monopéptidos azufrados. Actas de la V Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas [Madrid], 1959; Estudios metabólicos con cinc-65. I Datos preliminares sobre absorción y eliminación en conejos inyectados por vía intraperitoneal. Revista Española de Fisiología, 17(2), 1961, 81-88; Paso del Zn-65 a través de la placenta en coneja y distribución en órganos, fetos y estructuras placentarias. Actas de la VIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, 1963, 21; Contribución al estudio del metabolismo del cinc en conejo por medio del Zn-65. Actas de la Associação Portuguesa para o Progresso das Ciencias, 1962, 45; Estudios metabólicos con cinc-65. II. Influencia de la gestación sobre la distribución de este isótopo en conejas inyectadas por vía intramuscular y en su descendencia. Revista Española de Fisiología, 19(2), 1963, 83.
49. Expediente personal de Carmen García del Amo (ARANF, "Expedientes de Académicos correspondientes fallecidos", caja 2).
50. Oficio de 07/06/1977, dirigido a Nazario Díaz, Secretario perpetuo de la Real Academia de Farmacia. (ARANF, Secretaría, 541).

Si desea citar nuestro artículo:

**Mujeres en la academia: los inicios de la presencia femenina en nuestra corporación**

Rosa M. Basante Pol

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 627-646

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.26>



# LA FACULTAD DE FARMACIA, LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y LA TRANSICIÓN POLÍTICA ESPAÑOLA

## THE SCHOOL OF PHARMACY, THE COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID AND THE SPANISH POLITICAL TRANSITION

Santiago Cuéllar Rodríguez<sup>1</sup> y José Ángel Barberá Sáez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>2</sup>Departamento de Historia de la Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

corresponding author: santiago.cuellar.rodriguez@gmail.com

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

Tras de un somero análisis de la *Transición* política española, en este artículo trataremos de ofrecer una perspectiva general de lo que este proceso supuso para la sociedad española, para la universidad – en particular para la Universidad Complutense de Madrid, UCM – y, finalmente y en mayor extensión, para la facultad de Farmacia de la UCM. Hacerlo de forma exhaustiva, aportando además el correspondiente material gráfico documental, estaría por completo fuera de los límites de este artículo, por lo que nos ceñiremos a unos pocos aspectos concretos, que esperamos que sean suficientes para alcanzar una idea general, global, representativa y coherente de este periodo. Para ello, dirigiremos la mirada hacia Antonio Doadrio López, el decano de la Transición, la existencia de “asignaturas complementarias” impuestas por el régimen, las dificultades para actualizar el plan de estudios de Farmacia, el cambiante régimen académico, los aspectos demográficos y sociológicos más relevantes de los estudiantes, sus asociaciones y su participación, finalizando con el Boletín Informativo de la Facultad (BIF), donde se escribieron con letra pequeña algunos de los capítulos de esa gran historia que fue la Transición.

#### ABSTRACT

*After a brief analysis of the Spanish political transition, in this article we will try to offer a general perspective of what this process meant for Spanish society, for the university – in particular for the Complutense University of Madrid, UCM – and, finally and to a greater extent, for the School of Pharmacy of the UCM. Doing it exhaustively, also providing the corresponding documentary graphic material, would be completely outside the limits of this article, so we will stick to a few specific aspects, which we hope will be sufficient to reach a general, global, representative and consistent for this period. To do this, we will look at Antonio Doadrio López, the dean of the transition, the existence of “complementary academic subjects” imposed by the regime, the difficulties in updating the Pharmacy curriculum, the changing academic regime, the demographic and sociological aspects most relevant of students, their associations and participation, ending with the Informative Bulletin of the Faculty (BIF), where some of the chapters of that great story that was the Transition were written in fine print.*

#### Palabras Clave:

*Transición política española; Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia; planes de estudio; participación estudiantil; régimen académico.ar*

#### Keywords:

*Spanish political transition; Complutense University of Madrid, School of Pharmacy; academic curriculum; student participation; academic regimen.*

(\*) José Ángel Barberá Sáez falleció en marzo de 2017, siendo becario del Departamento de Historia de la Farmacia y mientras estaba finalizando su tesis doctoral, titulada “La Transición en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid”, cuya investigación documental ha sido fundamental para la elaboración de este artículo, que dedico a su memoria.



## 1. INTRODUCCIÓN

El término *Transición Española* o, simplemente, *la Transición* define no solo un proceso político, sino también social por el que España pasó de ser un sistema autocrático — en definitiva, una dictadura encarnada en la figura del general Francisco Franco — a constituir una democracia plena, de forma pacífica, en un periodo relativamente pequeño de tiempo — en términos históricos — y con un amplio consenso de la población, hasta el punto de convertirse en modelo para otros países. Este proceso de cambio afectó a prácticamente a todas las estructuras del Estado y de la sociedad, haciéndolas más libres, democráticas, abiertas a la crítica y funcionalmente eficientes. Esto también incluye a la universidad española, que estaba anclada en modelos caducos, instalaciones obsoletas, endogámica, reprimida por la ideología reaccionaria oficial, carente de libertad de cátedra y con escasos recursos materiales. La facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid arrastraba los mismos problemas, experimentando un cambio notable en el periodo 1973-1978, que cubre la breve descripción y el análisis de este estudio

La reconstrucción de la verdad de un periodo pasado siempre se enfrenta a grandes dificultades para documentar y verificar los fenómenos sucedidos, a lo que hay que añadir el riesgo de interpretarlos de acuerdo con lógicas ajustadas únicamente a la actualidad y al propio historiador. Posiblemente, la historia no conoce rígidas normas de causalidad sino tan solo inciertas relaciones de probabilidad bayesiana asociando diferentes eventos. ¿Quién puede tener seguridad al interpretar a alguien que vivió en momentos y lugares cuando y donde los usos y costumbres, los ideales sociales y las expectativas personales eran diferentes a las actuales y, en muchos casos, hoy desconocidas? Cualquier realidad trasciende a su historiador, especialmente cuando éste ha sido protagonista directo de la propia historia, porque la memoria personal se comporta muchas veces como la gravedad, la geometría del espaciotiempo, que deforma la trayectoria del haz de luz de la historia (1).

La historia es eso que sucedió gracias a cada uno de sus participantes, el resultado de las acciones e inhibiciones, ideas y emociones de todas — absolutamente todas — las personas, tanto como individuos o encarnando instituciones, organizaciones y colectivos, regulados o no por leyes. Además, la descripción de la historia o es sincrónica o tan solo será, como mucho, una bella narración, porque cualquier análisis de los eventos pasados que no considere rigurosamente y al mismo tiempo — sincrónicamente — los antecedentes y los cambios de las circunstancias económicas, climáticas, políticas, estructurales, lúdicas, relacionales, mediáticas, institucionales, religiosas, poblacionales — en su composición y migración — e ideológicas, entre otros muchos ámbitos, estará condenado a ser una publicación más con que rellenar las estanterías de la retórica inútil.

Por otro lado, al hablar o escribir sobre una determinada época de la historia, es habitual echar mano de alguna etiqueta que la describa (edad media, renacimiento, reconquista, ilustración, bárbaros, etc.), pero tales etiquetas suelen ofrecer una imagen excesivamente simple — y, por tanto, irreal — de la historia. Dividir a ésta en periodos temporales, territorios, movimientos políticos, filosóficos o religiosos, resumiéndolos con un único término, ofrece una imagen excesivamente simplificada y compartimentada de la realidad, y además introduce una forma particularmente insidiosa de sesgo que tiñe el fenómeno descrito con un color específico que condiciona su comprensión. La historia de la *Transición Política Española* también corre este riesgo.

La *Transición* del régimen político en España a mediados de la década de los 70 del siglo XX ha sido objeto de numerosos análisis, no siempre bien justificados y documentados. La manipulación y la ignorancia de eventos y contextos, y la animadversión personal — en un sentido u otro — no han estado ausentes en muchos de los análisis, especialmente de los procedentes de los extremos del arco iris político, confirmando que “*las tiranías fomentan la estupidez*”, como decían Jorge Luis Borges y, mucho antes que él, Aristóteles. Hacer historia es completamente diferente que adular al político en alza, al que decide el orden de las listas electorales, al que está dispuesto a todo — absolutamente todo — con tal de acceder o mantenerse en el poder. Por eso, es lamentable que haya historiadores y periodistas profesionales que se presten a ello; de hecho, probablemente no haya ningún gobierno u organización que en algún momento no haya *subvencionado* de forma generosa — con dinero público, por supuesto — a esos historiadores o periodistas, *pistoleros de la pluma a sueldo*, para alabar inexistentes virtudes, ocultar o justificar comportamientos bochornosos o incluso atroces, o convertir vergonzantes derrotas en prodigiosas victorias. España y sus nacionalidades no parecen ser una excepción (1).

Durante más de tres años, José Ángel Barberá Sáez, doctorando del Departamento de Historia de la Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, vino realizando un cuidadoso e ingente trabajo de investigación documental, buscando, seleccionando, ordenando, jerarquizando y dando sentido a una enorme cantidad de documentación — creó un archivo con más de 400 documentos escaneados y fotografías — en los departamentos, decanato y biblioteca de la facultad de Farmacia, así como en el rectorado de la Universidad Complutense, localizando en algunos casos documentos cuyos contenidos — e incluso existencia — eran ignorados por sus supuestos depositarios custodios.

Su tesis doctoral, titulada “*La Transición en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid*”, estaba siendo codirigida por el Profesor Francisco Javier Puerto Sarmiento y por el autor de este artículo (Santiago Cuéllar), pero quedó inconclusa



cuando ya se encontraba en muy avanzado nivel de desarrollo, como consecuencia del fallecimiento del doctorando. La bonhomía de José Ángel Barberá, su inagotable buen humor, su incompatibilidad con la hipocresía y la vanidad, su meticulosidad y capacidad de trabajo, y su permanente disponibilidad personal, dejaron un imborrable y entrañable recuerdo en todos los que le conocieron y, en especial, en los que tuvimos el privilegio de disfrutar de su amistad.

Sería no solo inadecuado historiográficamente, sino injusto pretender resumir en un artículo todos los sucesos, protagonistas, causas y consecuencias que ocurrieron y concurrieron en, por, con, antes y durante el complejo proceso de transitar la nación española desde un régimen autocrático hasta una democracia plena y constitucional de corte liberal, perfectamente equiparable a las existentes en los países políticamente más avanzados. Por ello, hemos elegido solo algunos fenómenos y anécdotas universitarias y políticas, centrándonos en ciertos rasgos que pueden ayudar a comprender — y, en su caso, a corregir la deformación interesada de la narrativa *negacionista* de determinados grupos políticos — lo que fue reconocido internacionalmente como un periodo extraordinariamente relevante y afortunado, aunque no exento de limitaciones y errores, de la historia de España, descendiendo desde lo más general de la política española y del ámbito universitario de aquel momento hasta algunas vicisitudes — unas entrañables y otras no tanto — de la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

La tesis fue estructurada con el objetivo de documentar la evolución de la facultad de Farmacia y el entorno universitario durante el periodo comprendido entre 1973 y 1978, por considerarlo particularmente relevante desde el punto de vista histórico, al incluir el atentado mortal contra el almirante Carrero Blanco, presidente del gobierno en aquel momento, la muerte del general Franco, el autodesmantelamiento del régimen autocrático, las primeras elecciones democráticas y la aprobación de la Constitución Española. En resumen, un somero análisis histórico de la *Transición* política española, la universidad y la vida universitaria del país, con particular énfasis en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y su facultad de Farmacia. Esta última, obviamente, constituyó el grueso de la investigación historiográfica de la tesis de Barberá, centrándose en su organización general, decanato, departamentos y servicios, planes de estudio, profesorado y alumnado. Este artículo recoge apenas una pequeña parte — y de forma muy abreviada — de la amplia investigación documental de Barberá, como una muestra que pretende ser significativa de lo que supuso la *Transición* para la sociedad española, para su universidad — especialmente para la Universidad Complutense de Madrid, la mayor de España — y, en particular, para un grupo de personas que aspiraban a vivir una nueva realidad en la facultad de Farmacia de la UCM, tanto desde el estudio como desde la investigación y la docencia, que fuese

mucho más luminosa y esperanzadora que la penumbra intelectual y la podredumbre ética que mantuvo el régimen dictatorial durante cuatro décadas. Hacerlo de forma exhaustiva, aportando además todo el material gráfico documental, estaría por completo fuera de los límites de este artículo, por lo que nos ceñiremos a unos pocos aspectos concretos pero suficientes para alcanzar una idea general, suficientemente representativa y coherente de este periodo.

## 2. LA TRANSICIÓN POLÍTICA ESPAÑOLA

Probablemente, las dos ocasiones en las que España adquirió un especial protagonismo en la Historia Universal durante el siglo XX fueron la Guerra Civil y el proceso de tránsito desde la autocracia a la democracia. Sobre este último hecho, Santos Juliá (2) considera que *la Transición "fue la consecución de las expectativas de normalidad democrática de una sociedad que sólo reivindicó que se elevaran a la condición de normativo lo que socialmente era normal"*. Para ello, la clase media española había ido experimentado un paulatino cambio social y cultural, donde muchos hijos de los vencedores de la guerra civil tomaron partido por la democracia y contra la dictadura, terreno en el que encontraron también a muchos hijos de los vencidos, como indica Juliá.

La *Transición* es una etiqueta demasiado simple para describir un amplio conjunto de graves cambios que no fueron instantáneos ni necesariamente coincidentes en el tiempo. Javier Tusell (3) considera que dentro del periodo de la dictadura España pasó de estar prácticamente subdesarrollada en los años cincuenta a ser en 1975, año de la muerte de Franco, uno de los doce países más desarrollados económicamente del mundo, haciendo más igualitaria a la sociedad española, una aspecto esencial que facilitó la evolución hacia un sistema democrático. Pero también contribuyó muy positivamente a la *Transición* la memoria de la guerra civil, como una catástrofe que no se debería repetir; por ello, el "cambio" que exigía aquella sociedad debía hacerse de forma pacífica, y en eso el conjunto de la clase política del momento mostró, en general, una gran altura de miras. Por añadir otro factor, entre otros muchos, que colaboraron en el éxito de la *Transición* cabe citar el aumento del contacto con el exterior y, en particular, con los países democráticos de Europa occidental, cuyas costumbres políticas "sonrojaban" al régimen de Franco, ayudando a que el autoritarismo perdiera terreno en la conciencia y costumbres de los españoles. Pero, quizá, una de las características que dan a la *Transición Española* su carácter particular es que fue planificada y ejecutada principalmente desde dentro del propio régimen dictatorial, sin que el ejército — cuyos altos mandos eran, en su gran mayoría, incondicionales seguidores del general Franco — pusiera dificultades especiales, ni aspirase a ningún tipo de protagonismo político, salvo a algunas contadas — aunque sonadas — ocasiones.



Una figura particularmente brillante del proceso fue Adolfo Suárez, sucesor de Arias Navarro en la presidencia del Gobierno pero, a diferencia de este último, con la inteligencia y la modestia necesaria para oír, aceptar consejos y plegarse a las circunstancias respetando la realidad, priorizando la necesidad de resolver las necesidades objetivas y las legítimas aspiraciones de la mayoría de los españoles. Como consecuencia, se cambió de manera radical la forma de tratar a la oposición política, con la que se iniciaron los primeros contactos. Como muestra relevante de ello, el Partido Comunista de España pudo presentar sus estatutos el 11 de febrero de 1977 en el Registro de Asociaciones, siendo el 9 de abril – Sábado Santo – el día de su definitiva legalización por parte del gobierno, noticia que fue anunciada a los españoles por el propio presidente del gobierno, Adolfo Suárez. Dicho anuncio dio la vuelta al mundo de forma instantánea, lo que convirtió en irreversible a la Transición.

A nivel universitario, un hecho destacable de este periodo fue la reintegración a sus puestos docentes de aquellos profesores que los habían perdido, como consecuencia de los sucesos estudiantiles del año 1965, provocando la separación de sus cátedras de José Luis López Aranguren, Agustín García Calvo, Mariano Aguilar Navarro y Santiago Montero Díaz, que habían presidido asambleas y manifestaciones, y de Enrique Tierno Galván, acusado de incitar al desorden en una asamblea.

### 3. LA UNIVERSIDAD Y LA TRANSICIÓN

Para Rafael Puyol, exrector de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), el año en que se produce una inflexión en la vida universitaria después del trauma de la guerra civil fue en 1956, año en el que tras los desórdenes producidos en la Universidad se detuvo a Dionisio Ridruejo, Rafael Sánchez-Mazas, José María Ruiz Gallardón, Gabriel Elorriaga, Enrique Múgica, Francisco Javier Pradera y Ramón Tamames, entre otros. Este episodio marcó un antes y un después en la actitud de la Universidad y de buena parte de los universitarios con el Régimen (4). El protagonismo de la Universidad en la contestación adquirió mayor dimensión paradójicamente gracias a una ley del propio Régimen: la Ley General de Educación (LGE; Ley 14/1970, de 4 de agosto, General de Educación y Financiamiento de la Reforma Educativa), que modernizó la enseñanza universitaria. Esta Ley y los importantes cambios económicos que se habían producido en España vinieron a justificar el rápido crecimiento del sistema universitario, que en la UCM supuso llegar a los 100.000 alumnos en 1975.

Todas las encuestas de finales de los setenta indicaban que la mayoría de los españoles quería un sistema político de tipo europeo. Esa conexión con Europa vino de la mano de la economía,

pero también de la sensibilidad europeísta de buena parte de la población y, en especial, de la Universidad española. Puede decirse que nunca como en la *Transición* la Universidad llegó a tener un protagonismo y una influencia mayor en el devenir de la historia de España.

Para Alberto Carrillo-Linares (5), el movimiento estudiantil, junto con otros movimientos sociales, especialmente el obrero, llevó a cabo un fuerte desgaste de la dictadura. En parte por la acción de los partidos políticos – ilegales – con presencia en la Universidad y en parte por la dinámica propia, hizo que la Universidad fuera un espacio incontrolable para el Régimen, incapaz no solo de satisfacer las reivindicaciones planteadas por los estudiantes sino de ofrecer el menor diálogo, con una obcecada tendencia a recurrir a la represión policial, todo lo cual configuró un panorama desmotivante para la mayoría de los alumnos y muchos de los profesores más destacados. Carrillo-Linares considera que la *Transición* se “cocinó” en la Universidad más que en ningún otro lugar, debido a una generación con una cultura política que rompió de lleno con la construida, fomentada por el Régimen y que pretendía dejar en herencia el propio franquismo. Incluso llega a considerar que la ruptura fue cultural antes que política, en forma de música, hábitos, consumo, modas, y la aceptación como hecho normal de lo que era normal en la cultura occidental: divorcio, sexo, feminismo, etc. El aire de modernidad social penetró, más que por ningún sitio, a través de las aulas universitarias, a veces incluso contra la moral enquistada de muchos de los partidos de la oposición, incluyendo a algunos de la izquierda tradicional. Además, la Universidad formó profesional e intelectualmente a los cuadros técnicos y políticos que abanderaron, desde los despachos, la Transición. De hecho, la dotaron de contenido social, propiciando – entre otros aspectos – la progresiva incorporación de la mujer a la política.

Sin embargo, para el *núcleo duro* del régimen de Franco, el objetivo primario era erradicar la *subversión* en la Universidad, mediante cualquier medio. Carrero Blanco consideraba a los alborotadores universitarios como “una pandilla de ateos, drogadictos y anarquistas”. Así lo manifestó (6) con motivo del estado de excepción decretado en enero de 1969 a raíz de la agitación universitaria: “Respeto a la juventud, sí, pero no abandono de la misma a los impactos incontrolados y agobiantes que el mundo actual lanza sobre ella. La defensa de nuestra juventud de los embates que hoy se lanzan contra ella para corromperla moral y materialmente constituye nuestra más grave responsabilidad. El “dejar hacer”, el cogerse de hombros ante esta situación, aceptando cómodamente las consecuencias de esta ofensiva que la juventud padece como “moda de los tiempos” puede que no sea una figura de delito en los Códigos humanos, pero sí lo es ante la conciencia de cualquier hombre honrado y desde luego ante el juicio de Dios”.





Figura 1.

En la figura 1 se muestra la foto de una asamblea con lanzamiento de octavillas en el vestíbulo de la Facultad de Derecho de la UCM, en 1973. El origen de esta fotografía es atribuido a la *Brigada Político-Social* (BPS) de la Policía; de hecho, pueden observarse dos pequeñas marcas señalando a dos estudiantes en torno a la pancarta con la foto de "Che" Guevara (los hemos enmarcado en la reproducción para facilitar su localización). En el margen de la foto original ponía "Identificar" (Archivo General de la Universidad Complutense de Madrid, OM-1284).

En la figura 2 se reproduce el número 17 (3 de mayo de 1974) de "*Mundo Obrero Rojo*", como ejemplo de las numerosas publicaciones de organizaciones políticas de extrema izquierda que circulaban por la universidad en la aquella época.

#### 4. LA TRANSICIÓN EN LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (UCM)

Todos los factores que impulsaron la *Transición* desde la Universidad española en general se reprodujeron en la Universidad Complutense de Madrid que, además, dispuso a partir de 1971 de unos *Estatutos provisionales*, por los que la hasta entonces *Universidad Central* pasaba a denominarse Universidad Complutense de Madrid (*Decreto 3857/1970, de 31 de diciembre, por el que se aprueban los Estatutos provisionales de la Universidad de Madrid*). Estos Estatutos contemplaban entre otras cosas la autonomía de la UCM, la organización departamental, el Patronato de la Universidad y sus funciones, la representación estudiantil, etc. En los mismos Estatutos provisionales se contemplaba una duración de tres años



Figura 2.

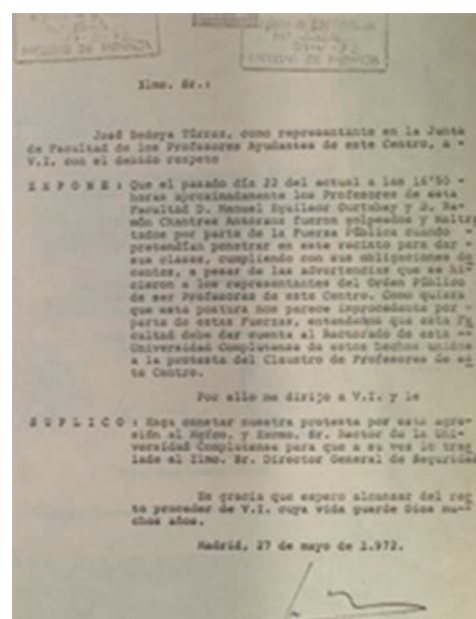


Figura 3.



hasta la aprobación de los definitivos; sin embargo, se prorrogaron dos veces, en 1974 y 1977, mediante sendas Órdenes Ministeriales.

Como Rafael Puyol indica, el desarrollo económico y la *Ley General de Educación* de 1970 propiciaron un importante crecimiento del alumnado universitario, que para la UCM supuso un problema de tal magnitud que el rectorado envió un informe al Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) en 1976 denunciando la gravísima situación, tanto en el orden académico como en el económico. Son multitud los documentos sobre las actuaciones de la fuerza pública — la Policía Armada, cuerpo antecesor de la Policía Nacional, conocida como “*los grises*” por el color de su uniforme — sobre los estudiantes, incluso hasta el fallecimiento “accidental” de algunos de los detenidos. Menos comunes son la reseñas periodísticas de las “actuaciones” de la fuerza pública sobre el profesorado. Sin embargo, están documentadas las quejas elevadas a los decanos y al rector por profesores de diversos centros, entre ellas la del profesor José Bedoya de la facultad de Farmacia (figura 3).

El rectorado venía obligado a emitir un “parte” diario mediante *telex* dirigido al MEC de las actividades no académicas — o sea “subversivas” — que se produjeran en el campus. Estos partes eran obligatorios y diarios aunque no se hubieran producido incidentes. La Dirección General de Universidades e Investigación — ya en el año 1976 — dio las normas a seguir para mantener el orden público en la Universidad. Estos partes disminuyeron mucho en el año 1977 y ya no se encuentra ninguno de 1978, lo que hace suponer que se dejaron de emitir.

Un aspecto que puede parecer menor pero que no deja de ser parte y configura la historia de la *Transición* en la UCM, es el *borrado o enmascarado de las pintadas políticas* que “decoraban” profusamente el exterior — y a veces también el interior, no así en la facultad de Farmacia — de todos los edificios. Aquellas pintadas solían aparecer borradas al día siguiente con pintura gris o enmascaradas para hacerlas supuestamente ilegibles. La encargada de

tales “borrados” era una empresa privada de pinturas y papeles pintados (figura 4), que cobraba puntualmente por su cometido, y en ocasiones, sus operarios tuvieron enfrentamientos con los estudiantes, por lo que la gerencia de la UCM consideró que estas actividades deberían hacerse fuera del horario lectivo y sería suficiente con hacer ilegibles las pintadas; en realidad, para la mayoría de los estudiantes de la época era evidente lo que las pintadas expresaban aunque fueran tachadas y lo que sí conseguía el “enmascaramiento” era ensuciar aún más las fachadas de las facultades.

Creemos importante dedicar un espacio al ministro Julio Rodríguez Martínez. Primero, por ser farmacéutico y además alumno del profesor Ángel Hoyos de Castro, decano de la facultad de Farmacia hasta el año 1975; y segundo, porque aunque su ministerio fue breve — apenas seis meses — puso “patas arriba” el sistema educativo español durante un curso lectivo con su “calendario juliano” y, en el caso específico de la UCM, con el agrio enfrentamiento con su rector por la creación de la llamada “cuarta Universidad de Madrid”, que estaría — presuntamente — repartida entre Madrid, Alcalá de Henares y Toledo, de tal manera que el Rectorado y la facultad de Medicina estarían en Madrid, las carreras de Ciencias en Alcalá y las de Letras en Toledo. El rector llegó a declarar que “*la decisión del Ministerio había sido hecha para colocar fuera de combate a la Universidad de Madrid*”.

Julio Rodríguez parecía manifestar una total sintonía con Carrero Blanco, siendo absolutamente beligerante contra la “*subversión*”, hasta el punto de manifestar que aquellos alumnos repetidores del curso selectivo (primero) eran “*fácil carne de cañón para los activistas*”. Tampoco demostró especial simpatía por los profesores no numerarios (PNN), de los que llegó a afirmar que “*con frecuencia, alumnos subversivos en junio se convertían en profesores ayudantes en octubre y hasta se encargaban de grupos de alumnos*”.

Su peculiar carácter político-religioso quedó plasmado en la misa funeral por Carrero Blanco, cuando Julio Rodríguez se negó

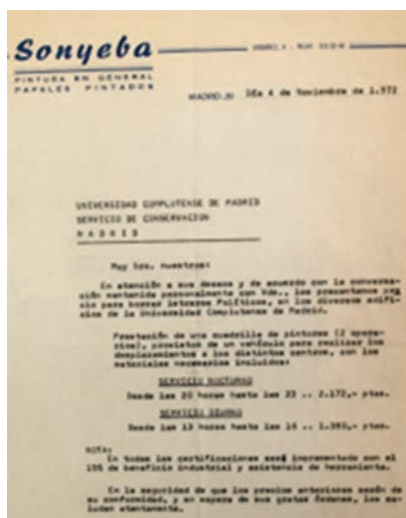


Figura 4.



Figura 5.



a aceptar el saludo de la paz del arzobispo Vicente Enrique y Tarancón, incluso a pesar de que Franco había abrazado sollozando al entonces presidente de la Conferencia Episcopal Española.

Julio Rodríguez Martínez (figura 5, de 1973) era doctor en Farmacia y en Ciencias Químicas, catedrático de Cristalografía y Mineralogía en la Universidad de Salamanca (1962) y en la Universidad Autónoma de Madrid (1968), de la que también fue rector (1972-1973) (7). Miembro del *Opus Dei*, procurador en Cortes entre 1971 y 1977, fue nombrado ministro de Educación del gobierno de Carrero Blanco el 9 de junio de 1973. A él se debe el “*calendario juliano*”, término humorístico con el que fue conocida su reforma del calendario académico universitario, que igualaba el año natural con el año académico (que en España finalizaba en aquella época a finales de junio y comenzaba entre mediados de septiembre y principios de octubre).

La reforma de Julio Rodríguez Martínez estableció el comienzo del curso el 7 de enero de cada año, acabando a finales del mes de diciembre. Dicho cambio, que solamente se llevó a cabo para el primer año de todas las universidades españolas, implicó que el curso que debía empezar en octubre de 1973 empezara en enero de 1974, con lo cual los estudiantes afectados tuvieron seis meses de vacaciones (aunque en muchos departamentos universitarios aprovecharon para adelantar la realización de las clases prácticas de algunas asignaturas). La medida produjo el rechazo general de la comunidad universitaria y de la administración de la época. Julio Rodríguez fue destituido como ministro el 3 de enero de 1974 y la Orden Ministerial que implantaba su “cambio” fue derogada a los pocos meses por un Decreto Ministerial de su sucesor en el cargo, Cruz Martínez Esteruelas, recuperando todas las universidades españolas el calendario ordinario al siguiente curso.

En lo que respecta al impacto del llamado “calendario juliano” en la facultad de Farmacia de Madrid, los más perjudicados fueron los alumnos que iniciaban su licenciatura en el curso 1973/74 que, en realidad, para ellos fue el “curso 1974/74” porque solo duró seis meses, de enero a junio. Fue la asignatura de primer curso *Histología y Organografía Vegetal* la más afectada, pues su periodo lectivo quedó reducido a dos meses por ser del segundo cuatrimestre. Como anécdota, el profesor Abad-Manrique, encargado de la misma, dijo con sorna el último día de clase: “*tras esta breve introducción, doy por terminadas las clases*”.

## 5. LA TRANSICIÓN EN LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UCM

Entre las promociones de estudiantes, a la correspondiente al periodo 1973/78 le tocó vivir muy particularmente todos y cada uno de los acontecimientos académicos y políticos que caracterizaron el fin del franquismo y el inicio de la *Transición* en la UCM y en la

facultad de Farmacia: el “calendario juliano”, el largo y accidentado desarrollo del Plan de Estudios de 1973; la desaparición de las oficialmente denominadas *asignaturas complementarias*, conocidas popularmente como “*las marías*” (religión, política y gimnasia); las primeras elecciones democráticas a delegados y la presencia por primera vez de alumnos en las juntas de facultad; los problemas suscitados por la creación de la facultad de Farmacia de Alcalá de Henares y la masificación de alumnos; y, anecdóticamente, la creación del *Boletín Informativo de Farmacia* por un grupo de alumnos.

Según indica Barberá — profesor ayudante de clases prácticas de Historia y Legislación — en sus notas para la tesis, algunos alumnos de primer curso de la promoción 2015/2016 dudaban de que en la Facultad de Farmacia, ni en el resto de la universidad, hubieran existido las “marías” y no entendían el significado de su presencia y aún menos su condición de obligatorias en una licenciatura universitaria. Obviamente, no habían leído los decretos de 1944 que implantaban dichas asignaturas, donde se especificaba cómo éstas “*son imprescindibles para una completa comprensión de la Química Orgánica, la Botánica o a la Bioquímica*”, como luego veremos.

La *Ley 83/1965, de 17 de julio, sobre estructura de las Facultades Universitarias y su Profesorado* modificaba la estructura interna de los departamentos, justificándolo en que “*el crecimiento del alumnado en las Universidades exige no sólo el adecuado acondicionamiento de espacios y el oportuno incremento de los medios didácticos, sino también y muy fundamentalmente la promoción de un Profesorado en número suficiente para que la relación alumno-profesor se mantenga en los términos reclamados por una enseñanza eficiente. (...) La estructura de la Cátedra, como la diferenciación del Profesorado, resultan hoy excesivamente limitadas. La realidad actual, y sobre todo, en relación con ella, el deber de proporcionar a nuestros estudiantes un clima más universal en su formación, obligan a una reconsideración de la situación presente en este aspecto fundamental de la vida universitaria*”.

Esta ley — impulsada por José Luis Villar Palasí — también creaba la figura del “profesor agregado”, al que definía como “*un nuevo tipo de Profesor universitario, de rango superior ya, en cuanto que dicta cursos regulares y dirige trabajos de investigación, pero en la generalidad de los casos sometido a la disciplina del Catedrático Jefe del Departamento al que figure adscrito por afinidad de contenido en su función docente*”. Una importante novedad fue que el «Departamento» integraba a partir de entonces no sólo a estos profesores agregados, al equipo de profesores adjuntos, ayudantes, jefes de clínicas, laboratorios y seminarios, y personal investigador, sino también — en su caso — a catedráticos de disciplinas afines, “*constituyendo una nueva unidad con auténtica coordinación en las*



Figura 6.

*enseñanzas, una mejor y más concentrada dotación de medios de trabajo y unos planes de investigación en ininterrumpido desarrollo que hagan de cada Departamento sede de un serio y bien atendido magisterio en su doble aspecto docente y creador".*

Dentro del periodo de nuestro estudio y por lo que respecta a la facultad de Farmacia, la estructura definitiva de sus Departamentos se culminó en 1974. Sin embargo, en aquel momento, los departamentos sólo agrupaban a una cátedra y el catedrático era además su director; es decir, en la práctica *departamento y cátedra* eran la misma realidad en la facultad de Farmacia y seguía imperando el sistema de cátedra única con la figura al frente del catedrático, con poderes prácticamente omnímodos. Esta situación era defendida algunos catedráticos de la época, como lo indican las manifestaciones del profesor Enrique Otero (figura 6, de 1973), con motivo de la creación de la facultad de Farmacia de Alcalá de Henares, quien propuso el 28 de junio de 1974 que en la nueva facultad se dotaran cátedras para todas las asignaturas *"con el fin de evitar los departamentos interfacultativos"*.

Algunas anécdotas sobre la vida cotidiana de la facultad pueden ayudar a comprender el ambiente que se respiraba en aquella época. Un ejemplo de ello son las clases teóricas de botánica impartidas por el profesor Salvador Rivas Goday. Barberá y el autor — entre otros alumnos de la época — pueden atestiguar la asistencia de alumnos de la vecina facultad de Medicina, que acudían para escuchar las anécdotas personales y los ingeniosos ejemplos con los que "don Salvador" ilustraba su docencia. Respecto a las *excursiones botánicas al campo*, era notable la presencia de "farmacéuticos consortes", denominación empleada por el profesor Rivas para los novios — o aspirantes a serlo — que en muchas ocasiones estudiaban en otras facultades, pero que acudían a las excursiones para ayudar solícitamente a la recogida de plantas a sus respectivas o "futuras" novias, alumnas de Farmacia. Tampoco era infrecuente la asistencia a las citadas excursiones de jóvenes amigos y familiares — solo varones, eso sí — de alumnos de la facultad de Farmacia, atraídos por

la presencia de alumnas, infrecuentes en el resto de las facultades de ciencias de la UCM — salvo Medicina y Enfermería — y, aún en mayor medida, en las escuelas de Ingeniería y Arquitectura de la vecina Universidad Politécnica de Madrid.

En 1973 la facultad de Farmacia se regía por un *Reglamento de Régimen Interno*, aprobado en febrero de 1972 por la junta de gobierno de la UCM, que pretendía regular todos los aspectos de la vida académica de la facultad. Uno de sus aspectos más curiosos era la composición de la Comisión del Patronato de la Facultad, determinada en el artículo 12 del citado Reglamento y que quedaba constituido por vocales representantes de la *Real Academia Nacional de Farmacia*, del *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC), del *Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos* (CGCOF) y del *Sindicato Nacional de Industrias Químicas*, sin olvidar los vocales más llamativos: los representantes de la *Comisaría de Abastecimientos y Transportes* (CAT) y de las *Asociaciones de Padres de Alumnos y Exalumnos de la Facultad de Farmacia*.

¿Por qué había un representante de la CAT en el Patronato de la facultad de Farmacia, un organismo creado en 1939 con la función de regular y controlar por el Estado el servicio de abastecimientos de primera necesidad y el racionamiento de los artículos de primera necesidad en España hasta 1952? En realidad, a partir de esa fecha, con la desaparición del racionamiento, la Comisaría empezó a perder competencias, pero a pesar de ello se mantuvo hasta 1981, año en que desapareció. El otro vocal "llamativo" fue el de las *Asociaciones de Padres de Alumnos y Exalumnos de la facultad de Farmacia*. Este vocal provenía de la LGE de 1970 que contemplaba por primera vez la creación de asociaciones de padres de alumnos que pudieran intervenir en los centros docentes (Título segundo. Centros docentes, artículo 57). No obstante, esto quedó en un mero enunciado y no se elaboró la normativa que hiciera efectivo el funcionamiento de tales asociaciones ni la presencia del vocal correspondiente.

También el Reglamento indicaba que la facultad formaba parte del *Patronato Interuniversitario del Jardín Botánico de la UCM*, que supuestamente se encargaría de dirigir las labores docentes interuniversitarias en el nuevo *Jardín Botánico* que se ubicaría en la zona comprendida entre las Facultades de Ciencias y Farmacia con una extensión de 80.000 metros cuadrados. Este Jardín Botánico tardaría 43 años en concretarse.

La Biblioteca de la Facultad que, según el Reglamento de Régimen Interno, formaba parte de la organización científica, administrativa y técnica, siempre mantuvo una notable falta de fondos bibliográficos, por lo que los alumnos de la época utilizaban su amplia sala y sus vetustas — aunque sólidas — mesas y sillas para el estudio o el intercambio de "apuntes" o de las publicaciones de los departamentos, que estaban rudimentariamente impresas o, simplemente, eran fotocopias *ad infinitum*.





Figura 7.

## 6. ANTONIO DOADRIO LÓPEZ, EL DECANO DE LA TRANSICIÓN

Antonio Doadrio López fue el auténtico “decano de la Transición” en la facultad de Farmacia, ya que como indicó el profesor Benito del Castillo (decano él mismo entre 1988 y 2008), fue a él a quien le correspondió hacer la auténtica Transición; en realidad, el profesor Ángel Hoyos de Castro fue decano hasta 1975, pero no tomó ninguna iniciativa en este sentido. Antonio Doadrio fue elegido para el cargo ese mismo año, desempeñándolo ininterrumpidamente hasta su jubilación académica, en 1986.

Contemplada casi medio siglo después de ese periodo, la figura de Antonio Doadrio López (figura 7, en 1975) se engrandece al valorar el esfuerzo, la inteligencia, la tolerancia y la diplomacia de las que hizo gala para dirigir con un delicado equilibrio la facultad de Farmacia, en un periodo extremadamente problemático que coincidió de lleno en lo político con la Transición, y en lo académico con la máxima masificación de la Facultad y la falta de medios y profesorado, tal como se aprecia en oficio remitido al rector de la UCM reflejado en la figura 8. También le “tocó” la culminación del Plan de Estudios de 1973, los acontecimientos desencadenados por los *Pactos de la Moncloa*, etc. Participó en las primeras elecciones democráticas a rector de la UCM, que tuvieron repercusión en la prensa general y en la que se calificaba al profesor Doadrio de *demócrata*.

Antonio Doadrio estudió la carrera de Farmacia simultáneamente con la de Ciencias Químicas, acabando sus estudios y el



Figura 8.

doctorado con Premio Extraordinario. Se incorporó como ayudante a la cátedra de Química Inorgánica y Analítica de la facultad de Farmacia de la Universidad Central, dirigida por su maestro el profesor Ricardo Montequí. Obtuvo por oposición la titularidad de dicha cátedra en 1964, y ese mismo año fue nombrado interventor general de la entonces Universidad Central (hoy UCM) y de ahí pasó a desempeñar el cargo de secretario general de la misma, para incorporarse en 1970 como subdirector general de Política Científica en el Ministerio de Educación y Ciencia hasta el año 1975, año que fue elegido decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. (8)

Un rasgo que define al profesor Doadrio, más allá de sus virtudes docentes — muchos de sus alumnos, incluido el autor, consideraban sus clases como un ejemplo de sencillez expositiva, rigor y amenidad — y científicas, es su talante abierto y la cercanía mostrada con los alumnos, como decano y como profesor. Como ejemplo de ello, no solo no dificultó sino que ayudó decisivamente a la creación del *Boletín Informativo de Farmacia* (BIF), una publicación a cargo de un pequeño grupo de estudiantes, ofreciendo apoyo material — una máquina de escribir, un pequeño local en el sótano con mobiliario básico y 25.000 pesetas para financiar la tirada del primer número — con la única condición de tratar respetuosamente a todas las personas, aun pudiendo ser críticas con ellas, y en lo que respecta a la política actuar con prudencia, pero sin establecer ningún tipo de veto. En este sentido, es preciso recordar que cuando se produjo la propuesta de creación del BIF todavía era presidente del gobierno de España Arias Navarro, por lo que no cabe duda de que,



como decano, asumió con gallardía un riesgo que otros no habrían aceptado, ante la posibilidad de que aquel pequeño grupo de estudiantes fuera, en realidad, una "célula" de algún partido radical de cualquier signo de los que en aquella época se asentaban en la UCM.

En las entrevistas concedidas al BIF, nunca eludió pronunciarse sobre todos los temas de cualquier índole que le plantearon, desde la gestión interna de la propia facultad a temas profesionales y políticos. Un elemento a destacar es — utilizando sus propias palabras — su *"ilusión por la creación del Boletín Informativo de Farmacia, que cubre la falta de una verdadera organización estudiantil"*.

## 7. LAS "MARÍAS" (ASIGNATURAS COMPLEMENTARIAS)

Las llamadas oficialmente "asignaturas complementarias" o "asignaturas no facultativas" — Formación Religiosa, Educación Física y Formación Política — que coloquialmente eran conocidas entre los alumnos como "las tres marías" o simplemente "las marías", tienen un indudable interés histórico porque, como decíamos, hay alumnos actuales que llegan a cuestionar su existencia en el pasado. Y, sin embargo, tuvieron un impacto académico real, puesto que era indispensable aprobarlas para obtener el título de licenciado, arquitecto o ingeniero en cualquier centro universitario español de la época.

Oficialmente, estas asignaturas se consideraban *"imprescindibles para dotar a los estudiantes universitarios de un bagaje moral y humanístico que los convertiría en las futuras clases directoras de la Patria a tono con las tradiciones seculares más arraigadas, con el espíritu animador de nuestra triunfadora Cruzada y con los nobles afanes de nuestros siglos más gloriosos"*. Tan importantes se consideraban que había que aprobar la religión en cuatro cursos y tres de política y gimnasia, dentro de los cinco cursos (aunque llegó a tener seis anteriormente) que constaba la licenciatura en Farmacia.

Un decreto de 26 de enero de 1944 (BOE de 8 febrero), estableciendo en la Universidades españolas la enseñanza religiosa, dio lugar a la creación de cátedras de religión como *"una necesidad urgente para los alumnos, ya que sin ella ni siquiera les sería dado entender nuestra literatura clásica (...) y mucho menos entenderían la Bioquímica, la Química Orgánica o la Farmacia Galénica"*. Incluso el año en el que comienza nuestro estudio — 1973 — se publicó una resolución de la Dirección General de Universidades en la que se indicaba que la enseñanza de la religión formaría parte, con *carácter obligatorio*, de la enseñanza de todas las Universidades, tanto estatales como no estatales. Sin embargo, perdió tal carácter en diciembre de 1976 y, de hecho, en esa época el único requisito real

para aprobar la asignatura era recoger — sin ninguna otra exigencia — la "papeleta" con la calificación de aprobado en la conserjería de la facultad un día del mes de junio, pertinentemente anunciado en el tablón de avisos fijado en las columnas del vestíbulo de entrada.

Por su parte, el establecimiento de *"cursos de formación política"* se justificaba en el Decreto de 29 de marzo de 1944 (BOE de 10 abril) por la necesidad de *"inculcar en los estudiantes una conciencia activa del servicio a Dios y a la Patria, ya que sin esta formación adicional de las aulas saldrían profesionales y técnicos, pero nunca hombres completos"*. Además la asignatura permitiría al estudiante adquirir *"un fervor lúcido y profundo a España"*. A diferencia de la religión, de esta asignatura sí hubo exámenes, aunque en ellos era práctica común copiar *ad libitum* las respuestas de un libro de texto o incluso suplantar a un alumno examinando por otra persona, sin que los cuidadores del examen pusieran excesivo celo en evitarlo (de hecho, no había comprobación documental y la vigilancia era muy laxa).

Respecto a la asignatura *Educación Física*, en el correspondiente Decreto de 29 de marzo (en el mismo BOE que el formación política) se indicaba que su finalidad era la de *"romper la rutina del estudiante y renovar el empeño y la energía en la vuelta al estudio"*. Es curioso ver la lista de deportes obligatorios y optativos distintos para alumnos y alumnas, con la particularidad de que estas últimas tenían como opción la de *"bailes populares"*, pero no así el fútbol, el esquí o la natación, que sí eran deportes admitidos para los alumnos varones.

Los alumnos y alumnas de la facultad de Farmacia tenían dos formas de aprobar la asignatura Educación Física: realizar 15 asistencias al gimnasio de la Facultad, en el que durante una hora y media se efectuaban — dirigidos por un profesor de educación física — tablas de ejercicios en distintos aparatos (espaldaras, escalera, cuerdas, potro, etc.), o bien inscribirse en el Club Deportivo de la Facultad a uno de los deportes que éste ofreciera.

Para la administración educativa de la época, el *idioma* era menos — bastante menos — importante que la religión, la política y la gimnasia; para los alumnos, era la "cuarta maría". De hecho, la normativa de 1954 solo obligaba a cursar el idioma un único año lectivo. En 1973, con la implantación del primer ciclo del Plan 73 y la modificación del mismo en 1975, se mantuvo un solo curso académico para el Idioma (inglés, francés o alemán) y no se citaba la obligatoriedad — que sí se contemplaba en 1965 — de que el alumno debía cursar un idioma distinto al del bachillerato. El examen solía consistir en la traducción al castellano de un párrafo — poco más de diez líneas — de un texto técnico o científico, para la cual se permitía el uso de diccionario.





## 8. ¿Y USTED A QUÉ PLAN DE ESTUDIOS PERTENECE?

Las vicisitudes por las que pasó la creación e implantación del *Plan de Estudios de 1973* de la facultad de Farmacia ponen de relieve el despiste generalizado de alumnos y profesorado sobre el mismo. Un muestreo realizado por el *Boletín Informativo de la Facultad* (BIF) indicó que solo el 53% de los encuestados sabían a qué Plan pertenecían (73 o 65).

Los motivos de este despiste general son diversos. De un lado, la larga gestación que arranca en 1970 con la LGE y no culmina hasta septiembre de 1978. Por otro, la incorporación o desaparición intermitente de algunas asignaturas, cuyo ejemplo más paradigmático es el de la *Biología* de primer curso. Así, en la reunión de la junta de facultad de mayo de 1970, para establecer las asignaturas del nuevo Plan de Estudios, se propuso la desaparición de la asignatura de *Biología* del primer curso, que era sustituida por las dos *Histologías* y *Organografías* (Animal y Vegetal). Pero un año más tarde, en mayo de 1971, se propuso de nuevo la *Biología* como asignatura de primer curso a costa de la desaparición de las *Histologías*, aunque incluyendo como asignatura de segundo curso la *Edafología*; apenas un mes después, una nueva junta de facultad hace reaparecer en primer curso a las dos *Histologías* más la *Biología* y añade en segundo año la *Parasitología*. Ya en 1973 una resolución de la Dirección General de Universidades e Investigación (DGUI) ratificaba la presencia en primer curso de las facultades de Farmacia de la *Biología* y las dos *Histologías*; y a finales de ese mismo año otras dos resoluciones del mismo organismo vuelven a ratificar las asignaturas de primer curso y el segundo curso con las asignaturas de *Parasitología* y *Edafología*. Pero en abril de 1975 en junta de facultad se aprueba una nueva modificación del primer ciclo del Plan del 73, volviendo a desaparecer la *Biología* de primero, aunque en la propuesta “camuflaba” esta desaparición denominando *Biología I* a la *Histología* y *Organografía Animal* y *Biología II* a la *Histología* y *Organografía Vegetal*; además se eliminaba la *Edafología* de segundo curso. Apenas tres meses después, en julio, una nueva resolución de la DGUI, refiriendo un acuerdo de los decanos de farmacia, plantea un primer curso exactamente igual al del Plan 65; es decir, con las asignaturas de: *Matemáticas*, *Física*, *Química*, *Biología* y *Geología*. Pero de nuevo, en mayo de 1976, en junta de facultad se acuerda eliminar la *Biología* de primer curso y sustituirla por las dos *Histologías*. Incluso en octubre del 77 la junta se dedicó a alcanzar un acuerdo sobre la *Biología*. No fue el único caso, ya que las *Técnicas Instrumentales* ascendían cada cierto tiempo del segundo al tercer curso, para descender de nuevo al segundo poco tiempo después.

Con esta larga gestación del Plan de estudios de 1973 y del “ser o no ser” de la *Biología* y las *Histologías* en el primer curso del citado Plan, los principales perjudicados fueron los alumnos de la promoción 73/78, que tuvieron la “suerte” de cursar un primero — curso 1973/74, en realidad 1974/74 — sobrecargado con 7 asig-

naturas en el más corto periodo lectivo (seis meses, no olvidemos el “calendario juliano”); es decir, con la *Biología* y las dos *Histologías*, además de las *Matemáticas*, *Física*, *Química* y *Geología*. Por si esto fuera poco, cuando llegaron a segundo curso — 1974/75 — también fueron “agraciados” con un curso desmesurado, formado por asignaturas tan densas como *Química Orgánica*, *Botánica*, *Química Inorgánica* y *Físico-Química*, a las que añadieron *Parasitología* y *Edafología* como asignaturas cuatrimestrales (la *Edafología* figuró solo en ese curso como asignatura de segundo año). Para rematar la andadura de los alumnos de la primera promoción del Plan 73, al llegar a cuarto — curso 76/77 — se encontraron que no existía el segundo ciclo del Plan 73, por lo que hubo que improvisar un cuarto y un quinto cursos a partir de los del Plan 65.

## 8. LA FACULTAD DE FARMACIA DE ALCALÁ DE HENARES

Otro hecho que se produjo durante la *Transición* y que tuvo su repercusión en la facultad de Farmacia de Madrid fue el de la creación de la facultad de Farmacia de Alcalá de Henares. Un complicado proceso que incluyó el enfrentamiento entre el ministro Julio Rodríguez y el rector de la UCM Ángel González, por la ya comentada *cuarta universidad de Madrid*. En el caso de Farmacia, la falta de planificación y, en no menor medida, las rencillas entre el profesorado provocaron importantes molestias a los alumnos, sometidos a un continuo “ir y venir” entre las facultades de Alcalá y de Madrid. Tras un primer curso en Alcalá, los alumnos tuvieron que ir a la facultad de Madrid para incorporarse al segundo curso en el periodo lectivo de 1976/77, con el consiguiente incremento de alumnos pero sin dotación suplementaria de profesorado de la facultad de Madrid. Pero, además, algunos docentes de la facultad de Madrid cuestionaron el hecho de que la mayoría del profesorado de la nueva Facultad de Farmacia no fuera farmacéutico, ni estuvieran claramente definidos los programas de las asignaturas que se impartían allí.

## 9. LOS ALUMNOS DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UCM

El periodo estudiado se caracteriza por un importante crecimiento del número de alumnos. La facultad de Farmacia de Madrid fue diseñada para albergar a un máximo de 1.500 alumnos, cifra que en realidad ya se había alcanzado en el curso 1949-1950, con 1.5441 alumnos matriculados, de los que el 53% eran varones. El curso 1951/52 fue el primero en el que las mujeres matriculadas (1.024) superaron (55 vs. 45%) a los varones (831). El doble de la capacidad original se alcanzó en el curso 1971/72, en el que se matricularon 2.986 alumno/as. Dentro del periodo 1973/78 la evolución de la población estudiantil de la Facultad de Farmacia de la UCM fue la siguiente, según el Instituto Nacional de Estadística:

- Curso 1973/74: 4.354 alumno/as matriculado/as (65% mujeres)
- Curso 1974/75: 5.331 (67%)
- Curso 1975/76: 6.067 (69%)
- Curso 1976/77: 6.310 (67%)
- Curso 1977/78: 7.014 (69%)

En el curso 1978/79 se inició el descenso de la población estudiantil de la facultad de Farmacia de la UCM, con 6.079 alumnos (71% mujeres); descenso que continuó en el curso 1979/80, (5.857 alumno/as) y se mantuvo a lo largo de la década, en la que en ningún año se llegó a los 5.000. En los noventa continuó esta tendencia a la baja de la población de estudiantes (menos de 4.000 en el curso 1996/97), que en el año 2014 apenas superó los 2.000 (2.039).

En la junta de profesores numerarios del 19 de octubre de 1973 el profesor Ángel Santos-Ruiz pidió la limitación de ingreso de nuevos alumnos ante la masificación de determinadas clases, sobre todo en los dos primeros cursos; tras la discusión correspondiente, se acordó que se hacía imperativo limitar el número de alumnos de nuevo ingreso. El profesor Santos-Ruiz volvió a reiterar la petición de limitación de ingreso de nuevos alumnos en la junta del 4 de febrero de 1974 y en la del 26 de octubre pidió no admitir matrícula de alumnos libres en primer curso del Plan 73 para curso 1974/75.

En la junta de facultad celebrada el 15 de julio de 1975, el decano (Dr. Doadrio) informó que se habían presentado 1.511 solicitudes de ingreso en primero, pero que solo se admitirían 400, que era la cifra máxima para la disponibilidad de aulas, laboratorios y profesorado. Por otro lado, el profesor Guillermo Folch indicó que además de los alumnos de nuevo ingreso había otras formas de acceso a la Facultad: alumnos provenientes de colegios universitarios, convalidaciones, traslados, etc., que planteaban sobre todo problemas de masificación en cuarto curso. En la junta del 22 de septiembre de 1976 la *Comisión de Admisión y Régimen de Alumnos* propuso que el número máximo de alumnos que pudieran matricularse en primero fuera de 300; no obstante, al final se fijó en un máximo de 500. En el acta se reflejó que el problema de la masificación se agravaba con el incremento de alumnos en 2º y 3º curso, debido a los precedentes de Alcalá y del CEU que había que admitir obligatoriamente, pues ya eran estudiantes de la Universidad Complutense. Se decidió por unanimidad no admitir las solicitudes de admisión de alumnos rechazados en Medicina, que pusieron como segunda opción Farmacia, considerando que había alumnos que habían señalado Farmacia como primer opción y que no habían sido admitidos.

La junta de facultad del 16 de septiembre de 1977 decidió remitir un escrito al rector consistente en pedir la impugnación del *Decreto 2116/1977 de 23 julio, sobre Acceso a las Facultades, Es-*

*cuelas Técnicas Superiores y Colegios Universitarios*, ratificando la decisión de no admitir más de 400 alumnos en primero y si se obligara a admitir a más alumnos se pedía que se dotara a la Facultad de los medios necesarios para su atención. A este respecto, el profesor Enrique Otero indicó: *"Que como jefe del Departamento de Físico-Química y Técnicas Instrumentales, declino toda responsabilidad por las posibles deficiencias en la calidad de las enseñanzas, especialmente prácticas, que inevitablemente se producirían por la masificación del 2º Curso y que si no se encuentra la compensación debida por parte del alumnado, se podría llegar a situaciones límite que afectarían a las actividades docentes de todo el Departamento, que originarían su suspensión."*

Ya en 1978, la junta de facultad celebrada el 3 de mayo, el profesor Miguel Ladero incidía de nuevo en el hecho de la incorporación de nuevos alumnos a la Facultad en los diversos cursos evitando el control de la Comisión encargada de este tema, como era el caso de las convalidaciones, traslados, etc. El 20 de octubre de 1978 se celebró otra junta en la que se acordó no admitir a más de 250 alumnos en primer curso; y el 27 de octubre, en reunión de la *Comisión Permanente* se planteó el problema de los alumnos rechazados en Medicina y que habían indicado Farmacia como segunda opción, acordándose no admitir a: *"aquellos que han solicitado estudiar en el CEU, los que ya tienen una licenciatura, los alumnos extranjeros que dependan de otras universidades y aquellos que en su solicitud no han escrito de su puño y letra la carrera de Farmacia en 2º lugar"*.

Un hecho relevante fue el del número de alumnos "libres" de la Facultad de Farmacia de Madrid: 19% en el curso 74/75; 25% (76/77) y 12% (77/78). Esta situación perjudicó la adjudicación de dotaciones presupuestarias para la Facultad, ya que estas se hacían en función del número de alumnos oficiales de las facultades. En la junta celebrada el 26 de marzo de 1977 se acordó suprimir la enseñanza libre y que los alumnos libres fueran considerados como alumnos oficiales, u oficiales *autorizados* a los que administrativamente no pudieran hacerse oficiales.

## 10. EL (CAMBIANTE) RÉGIMEN ACADÉMICO



Figura 9.



Para ingresar como alumno de primer año en la facultad de Farmacia de la UCM, el futuro alumno debía haber sido admitido previamente por la Comisión correspondiente (artículos 78 a 82 de los *Estatutos provisionales*). Para efectuar la matrícula de primer curso, los nuevos alumnos admitidos debían presentar una copia compulsada del DNI, un certificado médico (incluyendo la indicación de estar vacunado contra el tifo y la viruela, y de no padecer enfermedad infecto-contagiosa), un certificado oficial de aprobación de las Pruebas de Madurez del Curso Preuniversitario o, en su caso, del Curso de Orientación Universitaria (COU), y cinco fotografías tamaño carnet. En el caso de las alumnas, adicionalmente, debían presentar un certificado oficial de haber realizado el Servicio Social (figura 9); obligación legal que se mantuvo hasta 1978 (*Real Decreto 1914/1978, de 19 de mayo, por el que se suprime el Servicio Social de la Mujer*).

En las facultades experimentales (Ciencias, Farmacia, Medicina y Veterinaria), el importe de la matriculación para el curso 1973/74 era de 3.000 pesetas para el curso completo, más 185 por tasas de secretaría y 171 para el seguro escolar, hasta totalizar 3.354 pesetas (figura 10). El importe de la matrícula de curso completo y las asignaturas fundamentales sueltas se fue incrementado hasta las 10.625 pesetas del curso 1977/78, lo que supone un aumento del 254%; mientras que el índice de precios al consumo (IPC) en el mismo periodo creció el 103%, según el INE.

Según el Instituto Nacional de Estadística (9), la variación

del Índice de Precios de Consumo (IPC) entre enero de 1974 (en lugar de septiembre de 1973, debido al retraso producido en el inicio del curso 1973/74, como consecuencia del "calendario juliano") y septiembre de 2021 (curso 2021/22) es del 1.505,8%. Esto supone que el coste de matriculación del primer curso completo en la facultad de Farmacia de la UCM se ha multiplicado por 5,3, pasando de las 3.355 pesetas (20,13€) de enero de 1974 a los 1.603,17€ que costaba la matrícula en septiembre de 2021 (10), en lugar de los 303,12€ que corresponderían aplicando el crecimiento medio del IPC durante el periodo de enero 1974 a septiembre 2021.

Como ya se ha indicado, los alumnos podían cursar los estudios como alumnos *oficiales* o *libres*. Estas dos modalidades venían establecidas desde 1949, por la *Ley de 16 de julio de 1949 por la que se reforma el artículo 18 de la Ley de Ordenación Universitaria de 29 de julio de 1943*, especificando que "la enseñanza libre será la cursada por aquellos alumnos que, no estando adscritos a la enseñanza anterior [oficial], realicen las pruebas de examen en la Universidad, por asignaturas y ante Tribunales compuestos por Catedráticos y Profesores de la misma, designados por la autoridad universitaria competente. Los alumnos de enseñanza libre pertenecientes a las Facultades de Ciencia, Medicina, Farmacia y Veterinaria habrán de presentar, a los efectos de ser admitidos a examen, la certificación de haber realizado los trabajos prácticos correspondientes en la Universidad o en establecimientos o Centros que antes de comenzar el curso académico hubiesen sido autorizados por el Rector, a propuesta de la Junta de la Facultad respectiva, para expedir tales certificaciones".

En su artículo 70, respecto a los alumnos oficiales, la Ley de 1943 especificaba que estos deberían "asistir obligatoriamente a las lecciones, tanto de cursos facultativos como de enseñanza religiosa, o de los Institutos Escuelas, a las de formación política y demás enseñanzas complementarias, y obtener, según las normas de esta Ley, la dispensa de escolaridad establecida para los diversos estudios". En 1967, un decreto de 31 de mayo regulaba la asistencia a clase de los alumnos y las convocatorias de examen en cursos no selectivos. Se motivaba el decreto por "la imperiosa necesidad de velar por el mejor rendimiento de la enseñanza, que obliga a condicionar la asistencia a clase y convocatorias de examen de acuerdo con criterios objetivos de aprovechamiento escolar universalmente establecidos, con garantías suficientes para los alumnos y mejores posibilidades para sus estudios". Así, el artículo primero suprimía la asistencia obligatoria a clase y a las demás actividades docentes de los alumnos libres en las Universidades con más de diez mil alumnos oficiales; en el resto de las Universidades la propuesta quedaba a criterio de los rectores.

El artículo segundo determinaba que en todas las Universidades los alumnos dispondrán de cuatro convocatorias de examen consecutivas en cada disciplina, contemplándose la posibilidad de que la cuarta convocatoria pudiera hacerse ante un tribunal si el

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FARMACIA  
INSTITUTO DE

RESERVA DE MATRÍCULA

Matrícula: 1000000  
Tasa: 185000  
Seguro escolar: 171000  
Total: 3354000

Asignaturas matriculadas:

ASIGNATURAS	MATRÍCULADAS
MATEMÁTICAS	
FÍSICA	
QUÍMICA GENERAL	
QUÍMICA	
QUÍMICA ORGANICA	
QUÍMICA ANALITICA	
QUÍMICA INDUSTRIAL	
QUÍMICA Y FARMACIA	
QUÍMICA Y FARMACIA	
QUÍMICA Y FARMACIA	

Madrid, 11 de mayo de 1974

Figura 10.





alumno lo solicitaba; pero esta circunstancia solo podría utilizarse en tres ocasiones durante toda la licenciatura. Además, si no se aprobaba la asignatura en las cuatro convocatorias el alumno no podría continuar sus estudios en esa Universidad, debiendo trasladarse a otra si quería continuar los estudios universitarios. El decreto también regulaba, en su artículo tercero, el paso a un curso superior con asignaturas fundamentales pendientes: una sola si el curso superior tuviera tres asignaturas; dos si tuviera cuatro o cinco; y tres si fuera de más de cinco asignatura.

La asistencia obligatoria a clase de los alumnos oficiales se regulaba en el artículo cuarto, que también indicaba cómo llevar a cabo el control. *"Un número de faltas, sin justificación, superior a veinte lecciones teóricas de clase alterna o a diez de las experimentales o de seminario determinará la pérdida de la convocatoria ordinaria [la de junio] de exámenes de la asignatura correspondiente"*.

Sin embargo, apenas quince días después se publicaba una Orden con normas aclaratorias al decreto del 31 de mayo. Solo para las convocatorias del curso académico 1966/67, se autorizaba a los rectores a dispensar convocatoria atendiendo a circunstancias personales del alumno relacionadas con planes de estudios de las distintas facultades, matriculaciones obligadas por exigencias administrativas, distinta ordenación de enseñanzas teóricas y prácticas en una misma asignatura y cualesquiera otra de análoga naturaleza. Una nueva Orden de 10 de septiembre de 1968 volvía a modificar al Decreto del 31 de mayo de 1967, concretamente a su artículo segundo en la se indicaba que además de las cuatro convocatorias consecutivas en cada disciplina con carácter oficial, en caso de agotarlas el alumno podría continuar los estudios como alumno libre y sin limitación de convocatorias.

En junio de 1969 se regulaba el "curso selectivo" en las Facultades mediante el *Decreto 1419/1969, de 26 de junio*, por el que se refunden las normas sobre el curso selectivo en las Facultades Universitarias. La justificación de esta regulación era la necesidad de unificar la norma, debido a las diferencias existentes entre facultades, que mientras unas aplicaban el carácter de selectivo a dos cursos — como en Filosofía y Letras — en otras no existían cursos selectivos — como en Ciencias Políticas, Económicas y Comerciales — y en otras estaba implantado en uno, como era el caso de la facultad de Farmacia. La norma establecía que *"en todas las facultades el primer curso de la licenciatura tendría carácter selectivo"*, lo que suponía que habría que aprobar todas las asignaturas del citado curso para pasar al curso segundo. Además, contemplaba que si un alumno agotaba las cuatro convocatorias oficiales podría pasar a la condición de alumno libre con otras dos convocatorias; solo en el caso de no aprobar tampoco la asignatura en estas dos convocatorias el alumno no podría continuar los estudios en la misma Facultad de cualquier Universidad que tuviese el mismo curso selectivo. Asimismo, establecía que para presentarse a la tercera convocatoria

habría que tener al menos una asignatura aprobada del curso selectivo, y para presentarse a la primera convocatoria libre deberían ser al menos dos las asignaturas aprobadas.

La dispensa de convocatoria se podría otorgar "cuando por circunstancias dignas de especial consideración el alumno desee no tomar parte en una convocatoria en la que estuviese matriculado, solicitará del rectorado respectivo, por instancia presentada con la debida antelación, que no se le compute tal convocatoria. Esta dispensa solo se concederá, mediante una justificación suficiente, por razones de trabajo, de enfermedad plenamente comprobable o circunstancias personales extrañas a la voluntad del alumno y suficientemente estimables.

El motivo del *Decreto-ley 9/1975, de 10 de julio*, de garantías para el funcionamiento institucional de la Universidad era *"corregir la grave situación en que se encontraba la Universidad por las alteraciones del orden académico durante el curso 1974/75 y para evitar una permanencia indefinida o en exceso prolongada de los estudiantes en la Universidad con evidente perjuicio para el interés general y para otros estudiantes merecedores de acceder a la misma"*. Para esta segunda premisa se decretaban medidas para limitar el tiempo de permanencia en la Universidad, estableciéndolo en *"el tiempo correspondiente a la duración de la licenciatura en cada plan de estudios más dos cursos más"*.

Esto suponía que en la facultad de Farmacia el tiempo máximo para finalizar la carrera era de siete años. Se determinaba, además, que los alumnos oficiales y libres tendrían derecho a cuatro convocatorias de examen en cada asignatura, *"que no podrán ser objeto de dispensa, se computarán sucesivamente y se entenderán agotadas en cada caso aunque el alumno no se presentase a examen, salvo enfermedad u otra causa que merezca análoga consideración, las cuales serán objeto de verificación oficial"*.

Este decreto fue modificado un año después por el *Real Decreto-ley 8/1976, de 16 de junio*, por el que se modifica parcialmente el *Decreto-ley 9/1975, de 10 de julio*, *"por la incidencia de nuevas situaciones académicas, como la renovación de los planes de estudio y el régimen de duración de muchas carreras, y porque además, dentro de unos límites establecidos, estas regulaciones deberían ser potestad de las Universidades de acuerdo con sus Estatutos, lo que permitiría adecuar tan importantes cuestiones a las peculiaridades de cada Universidad y de cada Centro"*.

La nueva normativa especificaba que la permanencia en la universidad de los alumnos se regularía por los Estatutos correspondientes, y en todo caso, esta no podría ser menor a dos cursos más de los previstos para la licenciatura. Igualmente, el número de convocatorias también serían reguladas por los Estatutos de cada universidad, que no podrían ser menos de cuatro ni más de seis, y en los exámenes en las dos últimas convocatorias tendrían lugar ante tribunales formados por tres profesores numerarios designados



por la facultad. Los alumnos de primer curso que no aprobaran ninguna asignatura en las convocatorias de junio y septiembre de un año académico y no hubieran tenido dispensa de convocatoria no podrían continuar los estudios en la facultad, aunque podrían iniciar estudios en otro centro. Si en este nuevo centro tampoco aprobaran ninguna asignatura de primero entre junio y septiembre no podrían cursar en lo sucesivo estudios universitarios. Este último supuesto podría preverse en los Estatutos para aplicarse también a los alumnos de segundo y tercer curso de licenciatura.

A pesar de las restricciones que legalmente estaban establecidas para la dispensa o "anulación" de convocatoria, para conseguir esta dispensa en la facultad de Farmacia de Madrid bastaba presentar, dentro del plazo que se establecía, una instancia dirigida al decano solicitándola. Esta instancia inicialmente manuscrita por el propio alumno pasó a disponer de un modelo de instancia elaborado por la propia Facultad, que acabó convirtiéndose en una simple cuartilla en la que solo había que indicar el nombre del alumno, número de expediente y matrícula, y las asignaturas cuya convocatoria se anulaba. Esta práctica dio lugar a una gran cantidad de solicitudes, lo que fue objeto de consideración en junta de facultad; así, en la celebrada el 21 de enero de 1977, el secretario de la facultad, profesor Manuel Ortega Mata, proponía que de las solicitudes de anulación presentadas en el plazo determinado se pasara copia a los departamentos respectivos, para que estos pudieran, en el momento de elaborara las actas de los exámenes, indicar ya en las mismas: "dispensado" o "convocatoria anulada", o bien "no presentado" en el caso de que no existiera la solicitud de anulación y el alumno no se hubiera presentado al examen.

Existía la convocatoria extraordinaria en febrero para aquellos alumnos con asignaturas pendientes; en caso de no aprobar tales asignaturas en esta convocatoria, al alumno sólo le quedaba en ese curso otra convocatoria — junio o septiembre — para esa asignatura. Se permitía en esta convocatoria hasta examinarse de un máximo de tres asignaturas pendientes fundamentales.

## 11. ENTIDADES REPRESENTATIVAS (O SEA, ASOCIACIONES) DE ESTUDIANTES EN LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UCM

Los cambios sociales y crecimiento de la población en las grandes ciudades venía ya originando en la década de los 60 del pasado siglo importantes dificultades en la enseñanza universitaria, lo que motivó el *Decreto-ley 5/1968, de 6 de junio*, sobre medidas urgentes de reestructuración universitaria, en cuyo preámbulo se señalaba que las "circunstancias sociales obligaban a cambiar la estructura de la Universidad española".

En principio, el Decreto-ley solo afectaría a los nuevos centros docentes que se creaban en virtud del mismo — las Universidades Autónomas de Madrid (UAM) y de Barcelona (UAB), entre otros — sin alterar la regulación de los ya existentes. Sin embargo, autorizaba la reestructuración de los distritos universitarios existentes con el fin de distribuir más adecuadamente a los alumnos, incrementando asimismo — en 200 — la plantilla de catedráticos numéricos de Universidad y las dotaciones de profesores adjuntos, con el fin de conseguir una media de 50 alumnos por profesor.

Un aspecto interesante del mencionado Decreto-ley es lo referente a las asociaciones de estudiantes, sobre las que indicaba que "el Gobierno, a propuesta del Ministro de Educación y Ciencia, podrá autorizar, en las Universidades existentes o de nueva creación, la constitución y organización de entidades representativas de estudiantes que permitan canalizar sus aspiraciones en cada Facultad o Universidad, siempre que aquéllas sean solicitadas por el porcentaje mínimo que se determine del alumnado del Centro". Para regular estas entidades representativas de estudiantes, se publicó el *Decreto 2248/1968, de 20 de septiembre*, sobre *Asociación de Estudiantes*, que mantuvo su vigencia legal durante el periodo de nuestro estudio (1973-78).

Estas asociaciones de estudiantes estaban inspiradas y orientadas por y para fines específicamente universitarios de fomento y de creación de bienes culturales, de formación humana y profesional responsable, pero sin olvidar "el respeto al orden jurídico que permitían la convivencia y armonía de los diversos sectores de la Nación", pudiendo ser promovidas solo por los alumnos que se hallasen en pleno uso de sus derechos académicos, es decir, que no hubiesen sido "expedientados". El número de promotores debería ser de al menos el 5% de los alumnos oficiales del centro o ámbito en el que la asociación pretendiera circunscribirse y formado por 50 alumnos, al menos. Los estatutos deberían ser aprobados por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) y debería existir en el rectorado de la Universidad un registro de las asociaciones autorizadas, que además de figurarían en un Registro Nacional de Asociaciones de Estudiantes del MEC.

Previendo la posibilidad de que las actividades de tales asociaciones se "desviasen" al ámbito de la política, las autoridades académicas y las direcciones generales competentes del MEC podrían decretar la suspensión de las actividades de las asociaciones estudiantiles por un plazo no superior a tres meses "cuando estas no atemperen su funcionamiento a lo dispuesto en el decreto", pudiendo suspender también actos concretos o acuerdos de las asociaciones que no se acomoden a lo establecido en este Decreto. En el caso de la UCM, el control sobre las asociaciones de estudiantes se canalizó a través del *Gabinete de Promociones Culturales del Servicio de Promoción y Asistencia Universitaria*, al frente de los cuales se designó al vicerrector Félix Pérez y Pérez; además, contaba con





Figura 11.

un representante de la *Asociación de Profesores no Numerarios* (PNN) de la UCM, un profesor de cada uno de los centros docentes de la UCM y el director del *Servicio de Promociones Culturales*; asimismo, tendría una serie de vocales en representación del personal administrativo y subalterno, y tres estudiantes. Con fecha de 20 de octubre de 1976, el citado Gabinete propuso la creación de la *Comisión de Actividades Culturales y Extensión Universitaria*, con el fin de recoger y estudiar todas las iniciativas — debidamente canalizadas a través de los decanos y directores de los centros de la Universidad — y proponer su resolución al rector de la UCM.

En la facultad de Farmacia se legalizaron varias asociaciones de estudiantes. Las más conocidas son el *Club Deportivo* (n.º 1 del registro), la *Tuna* (50), el *Grupo Universitario para la Defensa de la Naturaleza* (GUDENA, 80), el *Círculo de Estudiantes de Farmacia* (CEF, 87), La Bureta (88), la *Asociación de Cine Científico de la Facultad de Farmacia* (107) y la *Asociación Cultural de Farmacia* (sin número de registro conocido).

El *Club Deportivo* se constituyó en noviembre de 1968. En el curso 1976/77 ya tenía un presupuesto de 175.000 pesetas y la subvención de la UCM en 1978 alcanzó las 294.000. En el curso 1977/78, el Club organizaba equipos — mayoritariamente masculinos — de 15 modalidades deportivas, incluyendo el equipo de balonmano femenino que había sido creado el curso anterior (en la figura 11 se reproduce el carnet de alumno miembro del Club).

La *Tuna* de Farmacia se refundó en el curso 1958/59 a partir de la antigua tuna madrileña de Farmacia y renació gracias al entusiasmo de estudiantes antes pertenecientes a la tuna de Salamanca; sin embargo, en el registro de asociaciones de la UCM figura como entidad constituida en noviembre de 1973. Tuvo acceso a las subvenciones de la UCM y, en concreto, en 1977 recibió 35.000 de las 150.000 pesetas que había solicitado, aunque al año siguiente fue subvencionada con 89.215; en este mismo año el número de miembros era de 17. La Tuna de Farmacia publicó varios discos; en 1974 se editó uno bajo el sello de la compañía discográfica *Marfer*,

que más tarde se reeditó bajo el sello de *Gramusic*. Cabe mencionar que los dos cantantes solistas de la tuna fueron en esa grabación Antonio García Ordóñez "Toni" y Fernando Salvador Pérez "Sopi".

El *Grupo Universitario para la Defensa de la Naturaleza* (GUDENA) fue legalizado en mayo de 1976. En esta fecha, un oficio firmado por el decano Antonio Doadrio y dirigido al rector de la UCM certificaba su visto bueno, indicando que la Asociación contaba además con el apoyo de tres cátedras relacionadas con la Ecología y, aunque no se explicitan las cátedras en el oficio, probablemente corresponderían a Botánica, Edafología y Fisiología Vegetal. Los fines de la asociación eran promover y fomentar el amor a la naturaleza; encauzar a los universitarios con inquietudes de conservación de la naturaleza; y proteger y conservar el entorno natural. GUDENA tuvo bastante actividad; de hecho, en el momento de su legalización ya había elaborado sendos trabajos sobre los *pinos de Valsaín* y el *Mar de Ontígola*, en los que había contado con la participación de las cátedras de Botánica y Edafología de la facultad. En 1976 GUDENA contaba con 72 socios, que pasaron a 272 en 1977. En este mismo año recibió de la UCM una subvención de 110.000 pesetas y presentó diversos proyectos relativos a las variaciones climáticas por alteraciones de la flora, la reserva aves acuáticas en Aznalcóllar, la degradación vegetal de la Casa de Campo de Madrid, la flora y fauna cavernícola, y la flora endémica de la región Centro. GUDENA publicó varios artículos de carácter informativo y divulgativo en el *Boletín Informativo de la Facultad*.

El *Círculo de Estudiantes de Farmacia* (CEF), asociación registrada como de tipo "profesional", fue legalizada en diciembre de 1976. La cuota de asociado se estableció en 500 pesetas y sus fines declarados consistían en "*promover el desarrollo de los estudios y de la profesión de Farmacia entre sus asociados; ofrecer al asociado de una forma sencilla y concreta una visión de todos los aspectos que ofrece la profesión; lograr que el asociado adquiera un verdadero sentido de la ética profesional; estrechar los lazos de unión entre el estudiante y el farmacéutico profesional; y aspirar a crear una Federación Nacional de Estudiantes de Farmacia*". En el primer año de funcionamiento efectivo — 1977 — recibió una asignación del MEC de 40.000 pesetas, que el CEF destinó a organizar conferencias, difundir actividades profesionales y organizar visitas a laboratorios farmacéuticos.

En el n.º 6 del *Boletín Informativo de la Facultad* (BIF), el CEF publicó una nota de protesta firmada por su secretario general, en relación a la información que había aparecido en el número extraordinario del BIF, dedicado a la movilización de la facultad de Farmacia por los pactos de la Moncloa. En dicha nota se rechazaba la calificación dada por el redactor del BIF como "*derecha política*" al CEF, reafirmando éste su condición de "totalmente despolitizada"



y recomendando a la redacción del BIF *"unirse a nuestros esfuerzos en la reivindicación de nuestros derechos como estudiantes y futuros profesionales de la FARMACIA"*. Varios miembros del CEF se personaron en el local del BIF, llegando a amenazar a los redactores presentes con emprender acciones judiciales para *"defender el buen nombre del CEF"*. Todo quedó resuelto con la publicación en el BIF de la mencionada nota de protesta por parte del CEF que, en cualquier caso, habría sido publicada sin recurrir a la amenaza judicial, tal como los responsables del BIF hicieron saber al CEF, por ser ésta la práctica común de transparencia del BIF.

La *Bureta* era una asociación calificada como "cultural", que fue legalizada en febrero de 1977. La finalidad de la misma, según sus estatutos, era promover y participar en actividades culturales. En ese mismo año recibió 50.000 pesetas de la UCM. Las actividades realizadas por la asociación fueron la organización de recitales de poesía y música; de exposiciones de pintura y fotografía, así como conferencias; entre estas últimas cabe citar un ciclo sobre temas sanitarios y profesionales, la reforma de la Seguridad Social y la industria farmacéutica.

La *Asociación de Cine Científico* fue legalizada en abril de 1978, con la finalidad de estudiar, propagar y fomentar la producción y utilización de cine de temática científica, promoviendo cuantos actos pudieran facilitar el rápido desarrollo del mismo. El decanato permitió la utilización de los medios de la facultad (sala de proyección, proyector, pantalla) e incluso nombró a un profesor agregado experto en la materia — perteneciente a la *Asociación Internacional de Cine Científico* — para la ayudar en la programación y organización de las actividades. La asociación se estructuró con las siguientes secciones: Botánica y Fisiología Vegetal; Geología; Ciencias del suelo y Agricultura; Zoología y Parasitología; Química Orgánica e Inorgánica y procesos industriales; Física; Humanidades, Historia y Cultura.

La *Asociación Cultural de Farmacia* (ACF) no estaba — aparentemente — registrada oficialmente en el periodo estudiado; pese a ello, desarrolló un amplio conjunto de actividades, aunque con desigual fortuna participativa. Ciertamente, su organización interna estuvo sujeta a numerosas controversias, debido tanto a la marcada militancia política de varios de sus miembros como a su escasa capacidad operativa y organizativa, tal como recogía Salvador López-Tapia en el BIF nº 7: *"Actualmente la cifra de socios está por los ciento cuarenta. Que trabajen, no más de cinco"*. Tras este artículo, la ACF publicó en el BIF nº 8 una nota para desmentir estas afirmaciones, acusando al propio Salvador López-Tapia de *"no participar en las actividades de la asociación y no exponer sus quejas en una Reunión General que podía haber convocado él mismo"*.

## 12. LA PARTICIPACIÓN ESTUDIANTIL: LOS PRIMEROS DELEGADOS

En 1973 la participación estudiantil en la vida universitaria solo se podía ejercer oficialmente a través de las asociaciones de estudiantes, tal como estaba contemplado en el decreto de septiembre de 1968, que además centraba esta participación exclusivamente en *"actividades de carácter cultural y profesional"*.

La legislación sobre la participación estudiantil en la vida académica quedó definitivamente regulada en el periodo por el *Decreto 2925/1974, de 17 de octubre*, por el que se regula provisionalmente la participación estudiantil a nivel universitario y por la *Orden de 21 de octubre de 1974* que desarrollaba el citado decreto, considerando que *"para cumplir los fines que le son propios, la actividad universitaria ha de tener como base la participación de los destinatarios de la misma y que el estudiante universitario tiene que tener los cauces adecuados para participar plenamente en la vida académica, tanto en los aspectos docentes como formativos. Para ello, de una parte, ha de existir una representación estudiantil base de la presencia de los estudiantes en los Órganos Corporativos de las Universidades, del diálogo con la autoridad académica y de la crítica constructiva para una Universidad mejor (...). Esta representación ha de ser auténtica, es decir, elegida con las necesarias garantías de libertad, con intervención de la mayoría del alumnado representado y de forma que determine una real integración del mismo en la vida académica"*.

La representación estudiantil se configuró a nivel de curso o de grupo, cuando hubiera varios dentro de un mismo curso, de centro universitario y de universidad. Los alumnos representantes de cada curso se elegirían por procedimiento directo del que surgirían un delegado y un subdelegado de curso, y un número de consejeros igual al 5% de los alumnos oficiales matriculados, con un máximo de ocho. El delegado, subdelegado y consejeros conformarían el Consejo del Curso; el conjunto de delegados y subdelegados de los cursos conformaría el Consejo de Centro, que también elegiría a un delegado y un subdelegado, y cuya reunión de centros constituiría el Consejo de Universidad que, a su vez, elegiría a su delegado y subdelegado.

Podrían ser electores y candidatos los alumnos oficiales españoles con disfrute pleno de sus derechos académicos. La fecha de las elecciones las fijarían los decanos con la aprobación del rectorado. El día de las elecciones en cada curso o grupo se constituiría una mesa electoral que estaría presidida por un profesor designado por el decano y dos alumnos del curso que serían los que ocuparan, por orden alfabético, el primer y último lugar de la lista oficial de electores. Sólo sería válida la elección si el porcentaje de votos alcanzara el 50% de los alumnos oficiales de cada curso o grupo. Los candidatos deberían conseguir en primera vuelta la mayoría



absoluta de los votos válidos emitidos; si fuera necesario una segunda vuelta bastaría con el 25% de los votos emitidos válidos. El mandato de los alumnos elegidos como representantes sería de un año y comprendería tanto el periodo lectivo como el vacacional; los representantes cesarían en el momento de anunciarse la convocatoria nuevas elecciones.

Para la facultad de Farmacia se estableció el 21 de noviembre de 1974 como fecha de presentación de candidatos, y los días 26 y 29 de noviembre se celebrarían la primera y segunda vueltas respectivamente. Se entregaron a la facultad 9.000 papeletas y 100 formularios-modelos de actas, así como 9 urnas, estas últimas prestadas por el Ayuntamiento de Madrid. Ser delegado o subdelegado dependía del número de votos conseguido: el alumno más votado sería nombrado delegado, el siguiente en número de votos sería subdelegado y así sucesivamente se nombrarían los consejeros. En concreto, todos los representantes elegidos de la facultad de Farmacia lo fueron en segunda vuelta, ya que en la primera no se alcanzó el 50% de la participación que determinaba el decreto del 17 de octubre. También fue común la baja participación en el resto de los centros de la UCM.

Los elegidos en la facultad de Farmacia en noviembre de 1974 fueron los siguientes:

- Primer curso: Grupo A: Sin representación (no hubo *quorum* suficiente para obtener representantes); Grupo B: Delegado (D): Guillermo López Barba y Subdelegado (SD): Federico Gago Bádenas; Grupo C: Sin representación.
- Segundo curso: Grupo A: Sin representación. Grupo B: José María González Martín (D) y Joaquín Marina Ocaña (SD); Grupo C: Francisco Vara Pinedo (D) y José Vélez García-Nieto (SD).
- Tercer curso: Grupo A: Manuel Avilés Avilés (D) y Ángeles Dal-Re Saavedra (SD); Grupo B: José Enrique Martino Alba (D) y José Julio Sastre Lorca (SD).
- Cuarto curso: Opción A: Javier González Esteban (D) y Remedios Gómez Mata (SD); Opción B: Antonio Díaz Villar (D) y José González Chacón (SD).
- Quinto curso: Opción A: José María Amate (D) y Francisco Fernández (SD); Opción B: Isabel Moro González (D) y Joaquín Córdoba Lefler (SD).
- Grupo de repetidores: no se llegó a formar la mesa por falta de asistentes.
- Representantes del Centro: Isabel Moro González (D) y Joaquín Alonso Cuesta (SD).

A partir de 1975 los alumnos entraron oficialmente a formar parte de las juntas de facultad (9% de sus integrantes) y de claustro (15%). En el curso 1975/76 las elecciones a delegados se realizaron en diciembre de 1975; sin embargo, en la facultad de Farmacia no se consiguió la participación mínima exigida en nin-

guna mesa ni en ninguna votación, por lo que quedó sin representantes estudiantiles oficiales en ese curso. Sobre el curso 1976/77 no se ha encontrado ninguna información sobre los delegados elegidos; de hecho, en la documentación oficial archivada en el Rectorado sobre estas elecciones se indica expresamente la falta de las actas electorales de algunas facultades, entre ellas las de Farmacia. Tampoco se ha encontrado ningún dato relativo al curso 1977/78.

### 13. EL BOLETÍN INFORMATIVO DE FARMACIA (BIF)

La idea de crear un boletín de información nació en 1976 de un acuerdo de los “aspirantes a delegados” (candidatos sin *quorum* suficiente para ser elegidos) de la facultad de Farmacia. Recuérdese que en el curso 1975/76 ésta careció de representantes oficiales, por lo que los “aspirantes a delegados” que acordaron la creación del Boletín lo hicieron en realidad a título individual. Cabe indicar que la benévola disposición del decano — Antonio Doadrio López — les permitió actuar como “delegados en funciones”.

El objetivo era elaborar un medio de comunicación propio de los alumnos, un “órgano de expresión estudiantil”, que informaría de aspectos académicos de la Facultad y de cualquier otro tema, tanto interno como externo a la facultad de Farmacia, que se considerara de interés para los alumnos. Fueron Santiago Cuéllar, Antonio Jesús Bartolomé — que se habían presentado para delegados de tercer curso por el grupo A — y José Vélez — por el grupo B — los que asumieron la responsabilidad de materializarla, contando poco después con la implicación de José Luís Blanco y Salvador López-Tapia, también de tercero, y de Jorge Montero y Manuel Méndez, de primero, todos ellos animados más por su voluntad cívica que por su conocimiento periodístico. Al grupo de trabajo lo llamaron *Junta de Redacción* (JR), cuya primera medida fue dar nombre al proyecto: *Boletín Informativo de Farmacia* (BIF).

El primer paso ejecutivo fue reunirse con el decano de la Facultad — profesor Antonio Doadrio — para presentarle y explicarle el proyecto, así como solicitar apoyo económico y material, y la imprescindible autorización oficial. En representación de la Junta de Redacción (JR), acudió José Vélez.

A pesar de los temores sobre la viabilidad real del proyecto — recuérdese que en ese momento Carlos Arias Navarro era presidente del gobierno — el decano acogió de buen grado la idea, hasta el punto de que dio rápidamente orden de proporcionar un local (en realidad se utilizaron dos: el primero en lo que hoy es el Centro de Proteómica de la facultad, y el segundo fue ubicado en la planta sótano junto a la rampa de entrada de materiales, situado bajo el Departamento de Microbiología y que hoy pertenece al Departamento de Fisiología animal). Además, autorizó la utilización de la máquina de imprimir en *offset* de la Facultad y, por si fuera poco, dotó a la JR con 25.000 pesetas a fondo perdido para sufragar







El BIF siempre tuvo extensión superior a las 30 páginas, llegando en el nº 5 a un máximo de 55, conteniendo numerosos artículos y colaboraciones que mayoritariamente eran elaborados — y firmados — por los miembros de la JR, ante la falta de colaboración del alumnado y a pesar de los llamamientos a la misma que se hizo reiteradamente desde las propias páginas del Boletín. El BIF no se centró exclusivamente en los temas que afectaban a los alumnos ni a los de carácter “doméstico” de la facultad, sino que trató también asuntos profesionales, del profesorado (en especial, de los PNN), de la Universidad Complutense, etc.; además, la ecología, la cultura, las problemáticas sociales y la investigación estuvieron siempre presentes en sus páginas.

Aunque algunas secciones tenían un carácter intermitente, la mayoría eran fijas: Editorial; Encuestas; Visitando cátedras; Los cursos informan; Monografías (científicas); Asociaciones de alumnos; Universidad Complutense; El Colegio (de Madrid) habla; Deportes; Cartas al Boletín; Pasatiempos y crítica de espectáculos; Con lápiz ajeno (artículos de interés publicados en otras revistas); Página literaria y Colaboraciones (externas).

Más allá de lo rudimentario de los medios, también la redacción adolecía de evidentes carencias, propias de la bisoñez periodística de sus componentes. A título de ejemplo, en una de las entrevistas realizadas al decano Dr. Doadrio, no se nombró a éste ni una sola vez por su nombre (ni sus apellidos) a lo largo de toda la entrevista. A pesar de ello, los contenidos del Boletín fueron valorados reiteradamente — tres amplias encuestas a lo largo de sus tres años de vida editorial lo atestiguan — de forma muy favorable por los lectores que, no lo olvidemos, suponían entre el 10% y 20% del total de los alumnos matriculados y no menos del 50% de los que asistían regularmente a clase.

Todos los números, a excepción del último, tuvieron su editorial, generalmente dedicado al tema más “candente” en ese momento, ya fuera de la propia Facultad — “Operación Física-Química”, Plan de Estudios —, de ámbito profesional — “R 77”, “Operación Fleming” —, o político con repercusión en la profesión, como los *Pactos de la Moncloa*, que dieron lugar a la edición de un número extraordinario del Boletín. Asimismo, se editorializó sobre temas de interés para los alumnos, criticando las deficiencias — y, en algunos casos, las arbitrariedades — de algunos profesores y departamentos, del Rectorado y de otras instituciones oficiales, y de las organizaciones profesionales — Consejo General y Colegio de Farmacéuticos de Madrid —, sin olvidar a los propios alumnos de la Facultad y la propia autocrítica de la Junta de Redacción; críticas que podrían estar mejor o peor argumentadas, pero que en general se mantuvieron dentro de la corrección y el respeto a las personas. El detalle de los contenidos del BIF a lo largo de sus tres años (y 10 números) de trayectoria requeriría un artículo monográfico por la extensión de los temas, de los comentarios y, en no pocas ocasiones, de las respuestas de las personas interpeladas, que siempre tuvieron acceso libre a su derecho de réplica en el BIF.

Baste con lo indicado hasta aquí como una muestra de los “aires” que se respiraron en la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid entre 1973 y 1978, transcribiendo en el BIF con letra pequeña — pero ilusionada — algunos capítulos de esa gran historia que fue la Transición, en uno de los periodos más vertiginosos, inimaginables, emocionantes, controvertidos y esperanzadores de la historia de España en el siglo XX; un proceso que nos vacunó contra la intolerancia a la mayoría de los que la vivimos, y que acabó fructificando en los que posiblemente sean — a pesar de sus sombras — los mejores 50 años de la historia de España.

## 14. REFERENCIAS

1. Cuéllar Rodríguez S. 239. Editorial Vitrubio, Madrid; 2019. ISBN 9788494976384
2. Juliá S. Transición. Historia de una política española (1937-2017). Editorial Galaxia Gutenberg, Barcelona; 2017. ISBN: 9788416734771.
3. Tusell J. Hacia el final de la Transición. ArteHistoria. <http://www.artehistoria.com/v2/contextos/7470.htm>
4. Puyol R. El papel de la Universidad en la Transición. Fundación FAES. Madrid; 9 de diciembre de 2002. [http://www.fundacionfaes.org/file\\_upload/publication/pdf/20130425184824el-papel-de-la-universidad-en-la-transicion.pdf](http://www.fundacionfaes.org/file_upload/publication/pdf/20130425184824el-papel-de-la-universidad-en-la-transicion.pdf)
5. Carrillo-Linares A. Subversivos y malditos en la Universidad de Sevilla (1965-1977). Sevilla: Fundación Centro de Estudios Andaluces (2008). ISBN 9788461273522
6. Archivo General de la Administración (AGA). Presidencia, Secretaría General del Movimiento, Secretaría Técnica. Madrid. Caja 18.595, p. 20.
7. Wikipedia. Julio Rodríguez Martínez. [https://es.wikipedia.org/wiki/Julio\\_Rodr%C3%ADguez\\_Mart%C3%ADnez](https://es.wikipedia.org/wiki/Julio_Rodr%C3%ADguez_Mart%C3%ADnez)
8. Real Academia de la Historia. Antonio Doadrio López. <https://dbe.rah.es/biografias/25922/antonio-doadrio-lopez>
9. Instituto Nacional de Estadística. Cálculo de variaciones del Índice de Precios de Consumo (sistema IPC base 2021). <https://www.ine.es/varipc> (consultado el 26 de junio de 2022).
10. Universidad Complutense de Madrid. Precios de grado 2021-22. <https://www.ucm.es/informacion/precios-de-grado> (consultado el 26 de junio de 2022).

Si desea citar nuestro artículo:

**La Facultad de Farmacia, la Universidad Complutense de Madrid y la Transición política española**

Santiago Cuéllar Rodríguez y José Ángel Barberá Sáez

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. nº extra (2022) · pp. 647-666

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.27>



# LA DISPONIBILIDAD DE MEDICAMENTOS EN ESPAÑA

## THE AVAILABILITY OF MEDICINES IN SPAIN

**Emili Esteve Sala**

Director del Departamento Técnico de Farmaindustria

Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

**corresponding author:** eesteve@farmaindustria.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

En la Unión Europea (UE) se aplican procedimientos de autorización para incorporar los nuevos medicamentos y sus sucesivas modificaciones en las mismas condiciones en todos los Estados miembros. Sin embargo, la comercialización efectiva de medicamentos presenta diferencias y la armonización pretendida basada en una autorización única y válida para toda la UE, queda, en la práctica, fragmentada por la intervención posterior de los Estados miembros, competentes en materia de precio y reembolso.

La diferencia en la disponibilidad de medicamentos repercute en los pacientes cuando el producto no está comercializado de manera efectiva. España se encontraba en una posición intermedia en la UE, sin embargo, los últimos datos publicados, señalan un claro deterioro en la disponibilidad de nuevos medicamentos, alejándola de países como Alemania, Francia o Italia.

Por otra parte, además de las innovaciones, existe otra tipología de medicamentos con problemas de disponibilidad. Son medicamentos considerados esenciales en terapéutica y que vienen comercializándose desde hace años con una erosión continuada de sus precios, reduciéndose su viabilidad de comercialización. La AEMPS ha calificado en mayo de 2022 como medicamentos estratégicos algunos de estos medicamentos, esenciales desde un punto de vista terapéutico y, a la vez, vulnerables con relación a su suministro.

La intención de este artículo es revisar en las causas que más influyen en la disponibilidad de medicamentos en España y en los cambios que podrían favorecer su mejor acceso, tanto respecto a nuevos medicamentos como a medicamentos estratégicos.

#### ABSTRACT

*In the European Union (EU) procedures for the authorization of medicinal products are applied to incorporate new medicinal products and their successive amendments under the same conditions in all Member States. However, the effective marketing of medicinal products differs, and the intended harmonization based on a single authorization valid for the whole EU is fragmented by the subsequent intervention of the Member States responsible for price and reimbursement.*

*The difference in the availability of medicines affects patients when the product is not effectively marketed. Spain was in an intermediate position in the EU, however, the latest published data indicate a clear deterioration in the availability of new medicines, moving it away from countries such as Germany, France or Italy.*

*On the other hand, apart from innovations, there is another group of medicines with availability problems. They are medicines considered essential in therapeutics and that have been marketed for years with a continuous erosion of their prices, reducing their marketing viability. The AEMPS has qualified in May 2022 as strategic medicines some of these medicines, essential from a therapeutic point of view and, at the same time, vulnerable in relation to their supply.*

*The intention of this paper is to revise the causes that most influence the availability of medicines in Spain and the changes that could favor their better access, both with respect to new medicines and strategic medicines.*

#### Palabras Clave:

disponibilidad de medicamentos  
acceso a medicamentos  
medicamentos estratégicos  
medicamentos críticos

#### Keywords:

availability of medicine  
access to medicines  
strategic medicine  
critical medicines

## 1. LOS PROBLEMAS DE ENTRADA. ACCESO A LOS NUEVOS MEDICAMENTOS

### 1.1. Una sola autorización de comercialización en la UE.

Aunque en la Unión Europea (UE) existen diversos procedimientos para la obtención de la autorización de comercialización de un medicamento, hoy en día la gran mayoría de los medicamentos nuevos e innovadores pasan por el procedimiento de autorización centralizado para ser comercializados, según señala la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (1).

A través del procedimiento centralizado se obtiene una autorización de comercialización válida para toda la UE. De esta manera, los nuevos medicamentos se autorizan a partir de un dictamen (técnico) favorable del Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) que se convierte en una decisión (política) de la Comisión Europea, dando así validez a una autorización de comercialización única para todos los estados del Espacio Económico Europeo (2).

Aunque la autorización de comercialización de los medicamentos que constituyen una innovación y que son autorizados a través del procedimiento centralizado empieza a contar a partir de un determinado día (la fecha de notificación que se señala en el Diario Oficial de la UE), la disponibilidad de estos medicamentos dista mucho de ser igual en toda la UE.

### 1.2. Diferentes velocidades de acceso entre países.

El análisis de la disponibilidad de medicamentos en la UE se viene realizando desde 2004 por la consultora IQVIA para la Federación Europea de Asociaciones de la Industria Farmacéutica (EFPIA). Desde hace cuatro años se conoce como *W.A.I.T. indicator* por sus siglas en inglés (*Waiting to Access Innovative Therapies*) y es el mayor estudio europeo sobre disponibilidad y tiempo de acceso

de los pacientes a medicamentos innovadores. Este informe permite estimar la evolución en la disponibilidad y tiempo de acceso en nuestro país de los nuevos medicamentos autorizados en Europa en los años previos y comparar con los indicadores de los países de nuestro entorno.

El informe *WAIT* del 2021 (que analiza los nuevos medicamentos autorizados en Europa en el cuatrienio 2017-2020) (3) confirma el empeoramiento en estos indicadores, que ya fueron negativos para nuestro país en el informe de 2020 (Figura 1). Algunos datos relevantes del informe son los siguientes:

- La disponibilidad en España de los 160 nuevos medicamentos es de un 53% (un punto inferior al informe de 2020 y 5 puntos inferior al de 2019).
- El tiempo medio de acceso se incrementa hasta los 517 días (17 meses), que supone 64 días más respecto a 2020 y 103 respecto a 2019.
- Comparado con los países de nuestro entorno económico (Alemania, Francia, Italia e Inglaterra), en los que el porcentaje de disponibilidad oscila entre el 66% y el 92%, en España se observa un nivel inferior y un empeoramiento en los últimos dos años. El tiempo de acceso en España es también muy superior al de estos cuatro países, que oscila entre los 133 días en Alemania y los 429 en Italia, y la brecha ha aumentado.
- A esta peor disponibilidad y alargamiento de los tiempos se añade el elevado porcentaje de medicamentos que están financiados con restricción en la población candidata a los tratamientos (41% en España) más allá de lo recogido en la ficha técnica autorizada.
- Estos indicadores de acceso también son especialmente negativos en el caso de los medicamentos oncológicos y los medicamentos huérfanos, en los que España está bastante lejos de los países de su entorno e incluso por detrás de Portugal y Grecia.

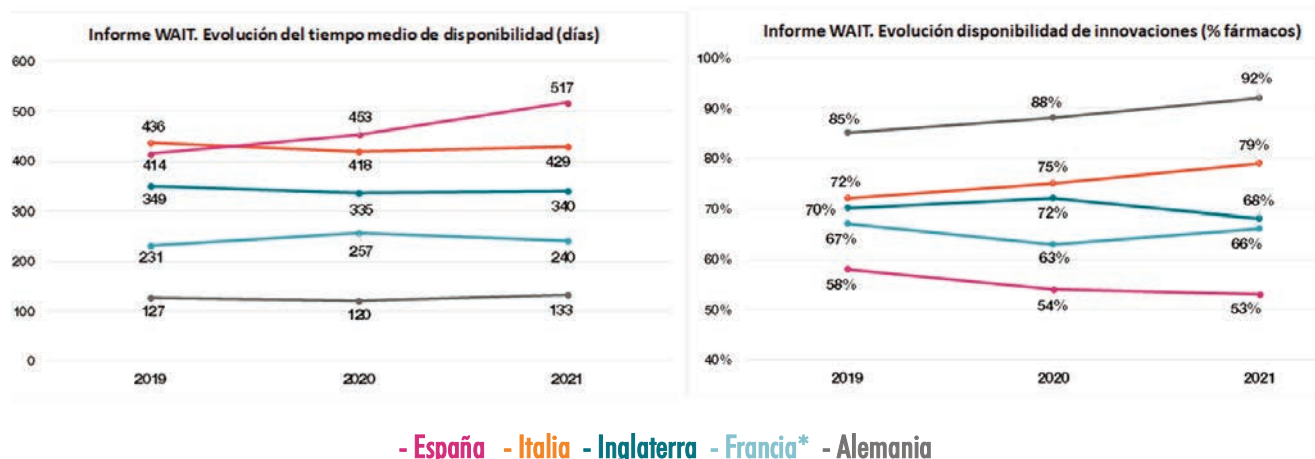


Figura 1. Evolución de tiempo medio y disponibilidad de innovaciones (% de medicamentos) Fuente: IQVIA, EFPIA Patients WAIT Indicator. Surveys 2019, 2020 y 2021. Nota: Para los tiempos en Francia se ha considerado que muchos de los medicamentos tienen disponibilidad inmediata por acceso temprano (ATU).

Los datos muestran que en comparación con el resto de los países de la UE-5, España empeora en los últimos años tanto en términos de disponibilidad como de tiempo de acceso, a pesar de ser un mercado muy atractivo por su organización y dimensiones.

### 1.3. Margen de mejora

La situación de entrada y disponibilidad de medicamentos en España, junto con otros aspectos relativos a la financiación de medicamentos y acceso, se han señalado asimismo en una serie de informes de relevancia emitidos por la Autoridad Independiente de Responsabilidad Fiscal (AIReF) (4), la Comisión Nacional de los Mercados y la Competencia (CNMC) (5) o la propia Dirección General de Cartera Común de Servicios del Sistema Nacional de Salud y Farmacia (DGCyF) (6). Como es natural, el foco o las recomendaciones de estos informes es distinto según su autoría, pero no parece estar en discusión la correlación entre las medidas regulatorias que se adopten y la disponibilidad efectiva de medicamentos.

El más reciente de los informes ha sido suscrito por el Comité Asesor para la Financiación de la Prestación Farmacéutica del SNS (CAPF) (7), que hace público un documento de consenso en junio de 2022 titulado: *Recomendaciones sobre los criterios y procedimiento para orientar la fijación de precios y la inclusión y exclusión, a la entrada en el mercado o con posterioridad, de un medicamento en la cobertura pública*.

Se trata de una relación de criterios que quieren promover un cambio en la forma de establecer la financiación pública y la intervención del precio en los medicamentos que se encuentran en periodo de exclusividad. El informe reconoce que el contenido de algunas de las recomendaciones ya está en marcha en menor o mayor medida, con algunos importantes progresos en algunas de ellas, pero en otras se requiere cambiar y mejorar la situación actual. En todo caso, aboga por un refuerzo de forma progresiva de los equipos técnicos actuales mientras se alcanza el pleno despliegue organizativo (plazo estimado de 2-3 años).

### 1.4. El pagador hace de regulador

En España, la decisión de financiar un medicamento y, en caso positivo, intervenir su precio requiere del dictamen favorable de la Comisión Interministerial de Precios de los Medicamentos (CIPM).

Aunque al principio esta Comisión estaba exclusivamente constituida por representantes de los distintos ministerios encargados de la sanidad, economía, hacienda e industria, en 2012 se amplió su composición dando acceso a las CCAA (8). Actualmente todas las CCAA están presentes en la CIPM y las decisiones se adoptan en general por consenso. En caso de votación, tres de ellas, rotatoriamente, tienen voto, estando las restantes presentes en calidad de oyentes.

La presencia masiva del principal pagador en la CIPM, es decir, de todas las CCAA, introduce un elemento que podría afectar negativamente a la disponibilidad de las novedades terapéuticas, no tanto porque el pagador proteja un impacto presupuestario derivado de la entrada de un nuevo medicamento -aspecto contemplado entre los criterios previstos en la Ley (Figura 2)-, sino por la dificultad que supone al pagador autonómico actuar como auténtico regulador (que debe mantenerse ajeno a la influencia tanto del productor como del consumidor) abstrayéndose de circunstancias presupuestarias autonómicas y tomando decisiones en un plano superior, para el beneficio del conjunto del país y de los pacientes.

Las propuestas de inclusión/inclusión de los nuevos medicamentos en la prestación farmacéutica del SNS de la CIPM, que son elevadas a la Dirección General de Cartera Común de Servicios del Sistema Nacional de Salud y Farmacia, se publican regularmente en un documento de Acuerdos, disponible en la web del Ministerio de Sanidad (9).

La inclusión de medicamentos en la financiación del Sistema Nacional de Salud se posibilita mediante la financiación selectiva y no indiscriminada teniendo en cuenta criterios generales, objetivos y publicados y, concretamente, los siguientes:

- a) Gravedad, duración y secuelas de las distintas patologías para las que resulten indicados.
- b) Necesidades específicas de ciertos colectivos.
- c) Valor terapéutico y social del medicamento y beneficio clínico incremental del mismo teniendo en cuenta su relación coste-efectividad.
- d) Racionalización del gasto público destinado a prestación farmacéutica e impacto presupuestario en el Sistema Nacional de Salud.
- e) Existencia de medicamentos u otras alternativas terapéuticas para las mismas afecciones a menor precio o inferior coste de tratamiento.
- f) Grado de innovación del medicamento.

Figura 2. Criterios para la inclusión de medicamentos en la financiación del SNS. Fuente: 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.

Las razones para proponer la no inclusión de los nuevos medicamentos tienen un redactado que se repite para muchas solicitudes: *criterios de racionalización del gasto público destinado a prestación farmacéutica e impacto presupuestario, incertidumbre del valor terapéutico, existencia de alternativas a menor coste de tratamiento.*

Aunque cada nuevo medicamento puede ser un caso en sí mismo, el repetitivo uso por la CIPM de los criterios para la no inclusión del medicamento en la prestación pública como la incertidumbre, la existencia de alternativas o la racionalización del gasto público, llevan, en la práctica y sin paliativos, a prolongar el proceso de financiación y precio en España retrasando el acceso y reduciendo la disponibilidad efectiva de medicamentos que sí están al alcance de los profesionales sanitarios y financiados en otros países de nuestro entorno.

## 2. LOS PROBLEMAS POR LA SALIDA DE MEDICAMENTOS DEL MERCADO

Un medicamento comercializado no está completamente exento de presentar a lo largo de su ciclo de vida un problema de suministro, habida cuenta de las abundantes e impredecibles causas que pueden motivarlo (10), como se indica en la Figura 3.

En muchas ocasiones, estos problemas son coyunturales y se subsanan por el laboratorio farmacéutico al cabo de un determinado lapso de tiempo, de manera que la falta de disponibilidad es meramente temporal.

Sin embargo, existe un grupo de medicamentos que requieren otro tipo de acciones para garantizar su mantenimiento en el mercado. En estos casos, el problema de disponibilidad tiene un componente estructural, muy probablemente relacionado con el precio o las condiciones de reembolso que, entre otras razones, llevan a las empresas a abandonar la comercialización de un medicamento en determinados mercados o en todos ellos.

La viabilidad comercial de un medicamento determina su permanencia en el mercado. Las compañías farmacéuticas, como todas las empresas, deben garantizar la rentabilidad de sus operaciones. Aunque la decisión dependerá de muchos factores, la lógica parece apoyar que, si el precio del producto es bajo y es escaso el volumen de sus ventas, será más complejo mantener su comercialización.

Las consecuencias de la salida del mercado de un medicamento pueden ser poco relevantes para pacientes, profesionales sanitarios y administraciones públicas si el lugar que ocupa dicho medicamento en terapéutica es escasamente relevante o cuenta con alternativas terapéuticas satisfactorias.

Causa raíz	Descripción
1. CALIDAD	Posible defecto de calidad con devolución de existencias. Incluye problemas de calidad de los principios activos, envases, material de acondicionamiento, etc
2. FABRICACIÓN	Interrupciones en el proceso de fabricación no relacionadas con calidad. Problemas de cumplimiento GMP. Problemas de capacidad
3. REGULACION	Retrasos en las autorizaciones programadas para adopción de cambios de envase, autorización de nuevas plantas de fabricación, etc. Falta de cumplimiento de requisitos de serialización. Incumplimiento de compromisos asociados a la autorización de comercialización
4. DEMANDA	Aumento inesperado de la demanda debido i) a la retirada de producto por problemas de calidad, ii) al cese/no comercialización esperable de alternativas (genéricos, biosimilares) iii) mayor demanda por una enfermedad específica, nuevas pautas de tratamiento, recomendaciones profesionales, epidemiología iv) cambio en las condiciones de reembolso/precio
5. DISTRIBUCIÓN	Problemas/retrasos en las cadenas de distribución. Colapsos logísticos, huelgas, desastres naturales, conflictos armados. Políticas de suministro, compromisos/cuotas, Comercio paralelo.
6. COMERCIALES	Falta de viabilidad económica para la comercialización del medicamento debido al precio (bajadas, imposibilidad de incrementos) o modificación en el reembolso. Bajo volumen de ventas. Mercado no prioritario

Figura 3. Principales causas que pueden generar un problema de suministro. Fuente: Elaboración propia a partir del documento: EMA/195884/2022. Guidance for Marketing Authorisation Holders on reporting the set of information for medicinal products included on the lists of critical medicines under the Regulation (EU) 2022/123 (15 Julio de 2022).



Sin embargo, si el medicamento se considera crítico, sin alternativas terapéuticas, la cesación en la comercialización puede suponer un importante problema sanitario.

Aunque el escenario ideal es que los medicamentos originales tengan seguidores genéricos o biosimilares que reduzcan la vulnerabilidad a los problemas de suministro, esto no siempre sucede. Para algunas presentaciones, el medicamento original es el único comercializado puesto que ninguna compañía está interesada en registrar su genérico o biosimilar. Son presentaciones altamente vulnerables puesto que si falla el suministro por el titular de la autorización de comercialización que las comercializa, el medicamento puede dejar de estar disponible en nuestro mercado (11).

## 2.1. La respuesta de la AEMPS. Los medicamentos estratégicos

Dado que el problema está identificado, está también justificado que la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) adopte iniciativas que frenen la salida de medicamentos de interés sanitario del mercado. La AEMPS ha establecido una nueva calificación de determinados medicamentos, que se denominan medicamentos estratégicos.

La definición de medicamento estratégico, a la espera de ser incorporada en nuestra legislación, se encuentra en la página web de la AEMPS (12) y se reproduce en la Figura 4.

Los medicamentos estratégicos son un grupo de medicamentos que cumplen simultáneamente los criterios de criticidad y de vulnerabilidad. El criterio de criticidad deriva de la importancia de la indicación terapéutica objeto del tratamiento. La vulnerabilidad se refiere al riesgo de que se produzca un problema de suministro de una presentación concreta que responda a una determinada descripción clínica de producto, es decir, los casos en que únicamente existan uno o dos medicamentos que tengan el mismo principio activo, dosis, unidad de dosis y forma farmacéutica.

Cuando la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios detalla los criterios de inclusión en el listado de medicamentos estratégicos señala que se han excluido de la relación aque-

llos medicamentos que, aun cumpliendo los criterios para ser considerados estratégicos, todavía se encuentran en periodo de protección y, por lo tanto, cuentan con otros mecanismos que garantizan su disponibilidad en el mercado.

Para la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios la necesidad de adopción de medidas adicionales regulatorias, económicas o de otra índole se centran en medicamentos en medicamentos clásicos, que han perdido la protección de la exclusividad.

Algunas de estas medidas ya se han materializado. Por ejemplo, en el programa PROFARMA, a la fabricación de principios activos y medicamentos estratégicos o esenciales en España se le otorga una valoración adicional con una horquilla entre 1 y 3 puntos en función del número de principios activos y medicamentos estratégicos o esenciales que fabrique la empresa en España, según listado elaborado o criterios establecidos por la AEMPS (13).

Otras medidas se han anunciado por la AEMPS en algunos foros especializados<sup>1</sup> siendo destacables la siguientes: i) facilidades para la presentación de solicitudes de registro para los medicamentos estratégicos asesorando a los laboratorios interesados durante todo el proceso ii) resolución rápida de variaciones para los medicamentos estratégicos autorizados iii) reducción de tasas en la presentación del dossier de registro y sus variaciones y iv) publicación en la página web de la AEMPS de un listado de medicamentos para los que se considere que existe una clara necesidad y para los que sería deseable disponer de nuevas autorizaciones de comercialización, bien por tratarse de medicamentos con problemas de suministro recurrentes o bien por posible suspensión o revocación de las autorizaciones existentes.

La relación de medicamentos estratégicos en su primera actualización, de 21 de julio, comprende 475 descripciones clínicas de producto (principio activo, dosis, unidad de dosis y forma farmacéutica) que contienen 254 principios activos y que se corresponden con 1321 presentaciones autorizadas de medicamentos. El acceso a la información sobre medicamentos estratégicos está disponible en la web de la AEMPS (12) y la Agencia indica que se actualizará regularmente.

- **Medicamentos esenciales:** de acuerdo con la definición de la OMS son los medicamentos mínimos necesarios para un sistema básico de salud.
- **Medicamentos críticos:** un subgrupo de los medicamentos esenciales para los que nunca deberían existir problemas de abastecimiento en el sistema sanitario.
- **Medicamentos estratégicos:** un subgrupo de los medicamentos críticos para los que se considera necesario adoptar medidas adicionales, bien regulatorias, económicas o de otra índole para garantizar su mantenimiento en el mercado tanto por su necesidad para la atención básica de la salud como por la vulnerabilidad de su cadena de suministro.

Figura 4. Definiciones de medicamento estratégico. Fuente: AEMPS (mayo de 2022).



## 2. 2. Medicamentos estratégicos. Mucha relevancia sanitaria y poco peso económico

Aunque no se han implantado todavía propuestas económicas expresas en relación con los medicamentos estratégicos que están incluidos en el Sistema de precios de referencia y quedan impactados por la erosión de los precios que se aplica en la revisión anual, desde la Orden de precios de referencia de 2018 (14), se ha venido aplicando una congelación de precios de terminados medicamentos considerados esenciales en respuesta a “...una indeseable situación de desabastecimiento de medicamentos esenciales, no sustituibles por ningún otro de los actualmente financiados por el Sistema ...”.

Según un análisis de estas presentaciones realizado por Farmaindustria realizado sobre la primera relación de medicamentos estratégicos publicada en mayo de 2022 y con el nomenclátor de dicho mes, de las 1305 presentaciones autorizadas, 419 estarían en el SPR (32%). Pero si consideramos únicamente las presentaciones financiadas (908), el porcentaje en SPR sería del 46%. En otras palabras, menos de la mitad de los medicamentos estratégicos están incluidos en el SPR.

Respecto al peso económico que tienen estos medicamentos, según el análisis efectuado por Farmaindustria de las presentaciones de medicamentos estratégicos sujetas a precios de referencia, éstas suponen aproximadamente un 1% del gasto (0,6% en Oficina de Farmacia; 1,8% en Hospitales).

## 3. PROPUESTAS PARA INCREMENTAR LA DISPONIBILIDAD DE MEDICAMENTOS

Para evitar un progresivo deterioro del arsenal terapéutico española deberían adoptarse una serie de medidas tendentes, por un lado, a acelerar la entrada de nuevos medicamentos y, por otro, a reducir la salida de medicamentos estratégicos (15).

Algunas organizaciones representativas de profesionales sanitarios, como la Federación de Asociaciones Científico Médicas de España (FACME), han anunciaron en julio de 2022 la constitución de un Grupo de Trabajo sobre Evaluación y Financiación Selectiva de Medicamentos cuyo objetivo es proponer mejoras al sistema de evaluación y toma de decisiones sobre la financiación pública de los fármacos (16).

También diversas organizaciones de pacientes han mostrado su preocupación por el mismo asunto. Por ejemplo, la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER) ha identificado tres necesidades clave: garantizar el acceso, garantizar la equidad y garantizar el acceso en tiempo. FEDER considera que el anteproyecto de Ley sobre garantías y uso de medicamentos constituye, «una oportunidad para garantizar el derecho a tratamiento en Enfermedades Raras» y en este sentido ha presentado sus aportaciones (17).

En relación con el acceso de nuevos medicamentos, Farmaindustria ha propuesto una serie de recomendaciones orientadas a mejorar la situación actual (Figura 5). Estas recomendaciones (15) recogen el sentir de la industria farmacéutica innovadora y además parecen alineadas con las declaraciones de representantes de profesionales sanitarios y pacientes (16, 17).

- 1 *Más predictibilidad, claridad y objetividad en los procedimientos y decisiones de precio y financiación de medicamentos innovadores, en línea con las recientes recomendaciones del Comité Asesor para la Financiación de la Prestación Farmacéutica<sup>2</sup>. Las reformas necesarias en estos procedimientos deberían permitir que se cumpla el plazo establecido en la legislación para la decisión sobre financiación (180 días, frente a los 517 días de media actuales) y lograr tasas de financiación de nuevos medicamentos autorizados más cercanas a las de nuestros vecinos europeos (actualmente sólo se financia en España el 53% de los medicamentos autorizados en la UE).*
- 2 *Separación clara de la evaluación terapéutica de la económica de los medicamentos innovadores y consideración del valor social total que aporta el medicamento, es decir, incluyendo ahorros sanitarios y no sanitarios e impacto sobre la productividad y el empleo.*
- 3 *Establecimiento de un sistema de acceso temprano de los fármacos que aporten mayor beneficio clínico, con participación de médicos y pacientes y con un precio provisional que se ajuste luego en base a resultados.*
- 4 *Identificación de las necesidades médicas no cubiertas y mecanismos específicos de precio y financiación para atender las enfermedades raras.*
- 5 *Seguimiento y mayor coordinación entre las CCAA para asegurar un acceso equitativo en todo el SNS a los medicamentos incluidos en la prestación, con indicadores de acceso que objetiven la situación y permitan corregir desviaciones.*
- 6 *Reconocimiento de la innovación incremental, en cuanto a su potencial para mejorar el tratamiento de enfermedades y de facilitar el uso adecuado del medicamento.*

Figura 5. Principales reformas recomendadas para mejorar el acceso a nuevos medicamentos. Fuente. Farmaindustria.

## 4. CONCLUSIONES

España es un país atractivo para que las compañías farmacéuticas comercialicen sus novedades terapéuticas y también para que mantengan la comercialización de medicamentos estratégicos. La más amplia disponibilidad de medicamentos autorizados y financiados en nuestro país supone una ventaja para sus profesionales sanitarios al ampliar el espectro de prescripción. También es provechoso para los pacientes, que pueden beneficiarse de estos medicamentos.

Por ello, es imperativo mejorar los actuales procedimientos reglamentarios de acceso de estas novedades terapéuticas. No parece justificado que el acceso a nuevos tratamientos necesarios para los pacientes quede condicionado por diseños burocráticos poco operativos que conllevan retrasos objetivables. Estos retrasos en el acceso son difícilmente justificables en el ámbito sanitario puesto que pueden ser muy perjudiciales en el tratamiento de pacientes concretos.

Igualmente, es necesario adoptar una normativa nacional que proteja la comercialización de los medicamentos estratégicos por su condición de esenciales y vulnerables a los problemas de suministro. Esta regulación debe orientarse a la actualización del precio de financiación, considerando su condición de estratégico de manera que se favorezca la disponibilidad en nuestro país de este tipo de medicamentos.

La anunciada modificación del anteproyecto que modificará la Ley de garantías de medicamentos y productos sanitarios constituye una oportunidad para lograr un necesario cambio de tendencia que contribuya a aumentar la disponibilidad de medicamentos nuevos y de medicamentos estratégicos.

<sup>1</sup> *Reunión del Grupo de Trabajo de Farmaindustria sobre Regulación Técnica del Medicamento celebrada el 7 de julio de 2022.*

## 5. REFERENCIAS

1. European Medicines Agency. Authorisation of medicines. Disponible en: (<https://www.ema.europa.eu/en/about-us/what-we-do/authorisation-medicines>).
2. Unión Europea. Reglamento (CE) n° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos (Texto pertinente a efectos del EEE). Disponible en: (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2004/726/oj/spa>).
3. IQVIA, EFPIA. Patients WAIT indicator. 2021 Survey. Disponible en: (<https://www.efpia.eu/media/636821/efpia-patients-wait-indicator-final.pdf>).
4. AIReF. Estudio medicamentos dispensados a través de receta médica. 2019. Disponible en: (<https://www.airef.es/wp-content/uploads/2019/06/Estudio2-SR/2019-07-02-P2-corregido.pdf>).
5. CNMC. Estudio sobre el Mercado de Distribución Mayorista de Medicamentos en España. 2022 Disponible en: (<https://www.cnmc.es/sites/default/files/4171318.pdf>).
6. Dirección General de Cartera Común de Servicios del Sistema Nacional de Salud y Farmacia. Documento informativo sobre la financiación y fijación de precio de los medicamentos en España. 2022 Disponible en: ([https://www.sanidad.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/20220526\\_Doc\\_Infor\\_Financiacion\\_Med\\_Esp.pdf](https://www.sanidad.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/20220526_Doc_Infor_Financiacion_Med_Esp.pdf)).
7. Comité Asesor para la Financiación de la Prestación Farmacéutica del SNS. Recomendaciones sobre los criterios y procedimiento para orientar la fijación de precios y la inclusión y exclusión, a la entrada en el mercado o con posterioridad, de un medicamento en la cobertura pública. 2022 Disponible en: ([https://www.sanidad.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/20220615\\_Recoms\\_Finales\\_LE2\\_LE2\\_2\\_CAPF\\_v15.pdf](https://www.sanidad.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/20220615_Recoms_Finales_LE2_LE2_2_CAPF_v15.pdf)).
8. España. Real Decreto 200/2012, de 23 de enero, por el que se desarrolla la estructura orgánica básica del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y se modifica el Real Decreto 1887/2011, de 30 de diciembre, por el que se establece la estructura orgánica básica de los departamentos ministeriales. BOE núm. 20, de 24 de enero de 2012. Disponible en: (<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2012-1034>).
9. Ministerio de Sanidad (página de inicio en internet) Comisión Interministerial de precios de medicamentos y productos sanitarios. Disponible en: (<https://www.sanidad.gob.es/profesionales/farmacia/CIPMyPS.htm>).
10. European Medicines Agency. Guidance for Marketing Authorisation Holders on reporting the set of information for medicinal products included on the lists of critical medicines under the Regulation (EU) 2022/123. EMA/195884/2022. Pendiente de publicar.
11. 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. Disponible en: (<https://bmjopen.bmj.com/content/9/1/e023054>).
12. AEMPS (página de inicio en internet). Medicamentos estratégicos. 2022. Disponible en: (<https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/medicamentos-estrategicos/>).



- 13 Secretaría General de Industria y de la PYME (página de inicio en internet), PROFARMA edición 2021 – 2022. Guía de evaluación. Disponible en: (<https://www.mincotur.gob.es/PortalAyudas/profarma/Descripcion/Documents/guia-evaluacion-aprobada.pdf> ).
- 14 España. Orden SCB/1244/2018, de 23 de noviembre, por la que se procede a la actualización en 2018 del sistema de precios de referencia de medicamentos en el Sistema Nacional de Salud. Disponible en: ([https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2018-16150](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2018-16150) )
- 15 Farmaindustria (página de inicio en internet). El acceso a los medicamentos en España: diagnóstico y recomendaciones. 2022. Disponible en: (<https://www.farmaindustria.es/web/documento/el-acceso-a-los-medicamentos-en-espana-diagnostico-y-recomendaciones/> )
- 16 FACME. Nota de prensa. Constituido el Grupo de Trabajo de FACME sobre Evaluación y Financiación Selectiva de Medicamentos. Disponible en: (<https://facme.es/wp-content/uploads/2022/07/1-07-2022NdP-Grupo-de-Trabajo-FACME-Medicamentos.pdf>)
- 17 FEDER. Posicionamiento sobre el anteproyecto de Ley sobre garantías y uso de medicamentos. Disponible en: (<https://www.enfermedades-raras.org/actualidad/posicionamientos/el-anteproyecto-de-ley-sobre-garantias-y-uso-de-medicamentos-una-oportunidad-para-garantizar-el-derecho-tratamiento-en-enfermedades-raras-segun-feder> ).

Si desea citar nuestro artículo:

**La disponibilidad de medicamentos en España**

Emili Esteve Sala

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022) · pp. 667-674

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.28>

# LA CONGREGACIÓN Y COLEGIO DE BOTICARIOS DEL SEÑOR SAN LUCAS Y NUESTRA SEÑORA DE LA PURIFICACIÓN DE MADRID (1654-1675)

## THE CONGREGATION AND COLLEGE OF APOTHECARIES OF 'SAN LUCAS Y NUESTRA SEÑORA DE LA PURIFICATION' OF MADRID' (1654-1675)

**Antonio González Bueno**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Orcid: 0000-0002-1933-4620

corresponding autor: agbuenoucm.es

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

#### RESUMEN

El 13 de marzo de 1650 Felipe IV firma, en Madrid, una Real Cédula mediante la cual el gremio de los boticarios de Madrid, organizado en torno a la cofradía del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación, queda exento de los impuestos propios de los trabajadores manuales; por ella, el oficio de boticario toma la consideración de 'arte científica'.

Nuestro análisis gira en torno al funcionamiento interno de este grupo de boticarios madrileños que, pese a su carácter religioso y asistencial, ostenta privilegios gremiales. Una 'micro-historia' de una pequeña comunidad profesional - el colectivo sobre el que se centra el estudio rara vez superó el medio centenar de miembros- para la que he utilizado la documentación conservada en el Archivo de la Real Academia Nacional de Farmacia [ARANF]; se trata, en su totalidad, de libros y escritos de carácter administrativo, contable en la mayor parte de los casos, pero cuyo análisis permite vislumbrar los problemas sociales e institucionales a los que se enfrenta este grupo profesional. Otra fuente de información, nada desdeñable, nos la proporcionan los textos de los que los miembros de este grupo son autores, particularmente los opúsculos, de corta tirada, en los que nos hacen partícipes de sus polémicas y de sus diferentes visiones sobre el modo en que evolucionan sus actividades profesionales.

#### Palabras Clave:

boticarios  
Madrid  
Siglo XVII  
agrupaciones profesionales

#### Keywords:

apothecaries  
Madrid  
XVII century  
professional groupse

#### ABSTRACT

*On March 13, 1650 Felipe IV signs, in Madrid, a Royal Certificate by which the guild of apothecaries of Madrid, organized around the brotherhood of 'Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación', are exempt from its own taxes of manual workers; for it, the apothecary trade is considered a 'scientific art'.*

*Our analysis revolves around the internal functioning of this group of Madrid apothecaries who, despite their religious and welfare nature, hold union privileges. A 'micro-history' of a small professional community -the group on which I center my study rarely exceeded fifty members- for which I have used the documentation preserved in the Archive of the Royal National Academy of Pharmacy [ARANF]. It is, in its entirety, books and writings of an administrative nature, accounting in most cases, but whose analysis allows us to glimpse the social and institutional problems faced by this professional group. Another source of information, not insignificant, is provided by the texts of which the members of this group are authors, particularly the short-run booklets, in which they make us part of their controversies and their different views on the way in which that their professional activities have to evolve.*



## 1. INTRODUCCIÓN

Los datos sobre la primitiva organización de los boticarios de la Corte se nos muestran esquivos; la más antigua documentación conservada alude a su creación en 1589 (1), bajo unas ordenanzas aprobadas por Gaspar de Quiroga y Vela (1512-1594), mientras ocupaba la Silla de la diócesis de Toledo (2); así debió de ser, pero no disponemos de otro testimonio que lo acredite. No cabe duda de que debió de existir un corpus documental complementario a este con el que trabajamos, pero lamentablemente hemos de considerarlo perdido (3).

Comenzamos a disponer de datos fehacientes sobre esta organización desde diciembre de 1654 (4); entonces, un grupo de cincuenta y tres boticarios, dotados ya de una estructura organizativa, que a todas luces tuvo que ser anterior, aprueban las cuentas de una Congregación en la que se aúna el carácter gremial -constituida sólo por los boticarios de la Corte- con el devocional, bajo la advocación a Nuestra Señora de la Purificación [la Candelaria] y el evangelista San Lucas.

La composición de este grupo de profesionales nos es bien conocida; esta primera acta conservada nos ofrece un listado de quiénes componían la Congregación; sin duda testimonio de la importancia que se concede a este escrito, pues no volverá a repetirse tal hecho. Resulta difícil explicar los motivos que llevan a esta Congregación a comenzar sus anotaciones en la fecha señalada; pero entre los gastos que se originan este año de 1654 quedan algunos de especial interés: "... a un Notario de la Bisita Por la suspensión de Ex Comunión que nos traía sobre exhibir los Libros de la Congregación"; a Juan García de Albertos, "para hacer Relacion de un memorial que se dio de la congregación al Prothomedicato"; "Doce Reales que se dieron en la contaduría de el Conde de Chinchon para buscar el pibilegio original de la defensa de Repartim<sup>to</sup>. de soldados..." (5).

Los datos nos obligan a movernos en el terreno de la hipótesis, pero parece probable que, en este 1659, asistiéramos a la 'regeneración' de una antigua Congregación de Boticarios, suspendida por no diligenciar adecuadamente sus libros de contabilidad, que vuelve a conformarse para defender sus privilegios gremiales, de los que no conservaban el original; por ello la necesidad de obtener copia del custodiado en el archivo del conde de Chinchón (6) y de exponer sus prerrogativas ante el Real Tribunal del Protomedicato, entidad a la que no estaba estatutariamente sujeta como cofradía, pero a la que sus componentes debían obediencia como parte de la estructura sanitaria estatal.

De la actividad de este colectivo, asociado con carácter gremial, nos quedan algunos testimonios vertidos por sus propios integrantes. En 1634, Pedro Gutiérrez de Arévalo (ff. 1604-m. 1656)

recuerda cómo, treinta años atrás, la Congregación de Boticarios de Madrid discutió, "y assi lo firmaron en el libro de sus juntas", las cantidades que habrían de conformar la composición napolitana de jacintos (7). De su quehacer en los años centrales del XVII da cuenta Jerónimo de la Fuente Pierola [Jerónimo de la Fuente Izcala (1599-1673-1683)], quien nos informa de las disputas sobre la identificación del succino (8), del uso del dorónico para la preparación de los polvos diaforéticos o de la utilización de *gallia moschata* en las preparaciones en que sólo *gallia* se indicase (9).

El testimonio de Fuente Pierola nos remite a la vinculación de los boticarios madrileños con el Real Tribunal del Protomedicato, al que sirven de asesores en algunos temas, particularmente en los referentes a la composición de medicamentos y en el *quid pro quo* de los simples; pero tal relación no parece establecerse con el colectivo sino con algunos de sus más preclaros miembros; así, tras recibir los escritos de Ambrosio Ximénez sobre la posible sustitución del dorónico, el protomédico Pedro Barba (ca. 1570-1662) (10) solicitó la opinión de quienes debían ser sus informantes habituales:

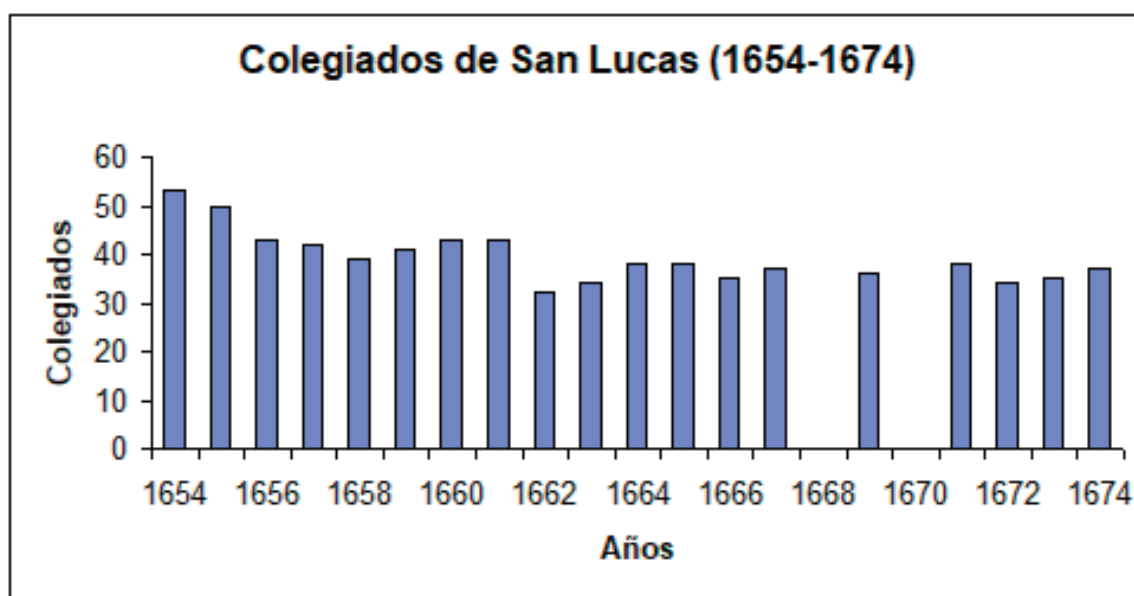
"... el qual los repartio entre Diego de Cortabilla y Sanabria, dignísimo Boticario de la Magestad del Rey nuestro Señor Felipe Quarto, y a Juan de Canseco meritorio Boticario de la señora Emperatriz, Bernardo de Moles, y Bartolome Estevan, disgnísimos Boticarios, este de los Reales Hospitales General, y Pasio[n], y el otro del Hospital Real de la Corte, y a mi como inferior de todos, a quienes encargó que mirassemos con cuidado la resolucio[n] de la questuo[n] q en aquel tratado, avia remitidole Ambrosio Ximenez Tauste [...] para lo qual dio quinze dias de termino, y que en su presencia le avia de resolver, y assi se hizo, y nemine discrepante, en presencia de dicho señor Presidente, sin controversia, ni repugnancia alguna se sento por doctrina se avia de seguir, como se sigue en esta Corte, la sobstitucion del doronico, q haze co[n] los clavos el Principe Avicena, cuya respuesta tenemos por cierto se remitió al dicho Tauste, mandandole que mudasse de parecer en la opinión que lleva..." (11).

Todos ellos boticarios de la Congregación y Colegio de Boticarios del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación de Madrid, pero que emiten su veredicto como 'Boticarios doctos de Madrid', no como representantes del colectivo gremial.

## 2. LOS CONGREGANTES-COLEGIALES

A la Congregación de Boticarios del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación pertenecieron sólo los boticarios asentados en la Corte, no todos, pero sí la mayor parte (12). La condición de boticario establecido en la Corte fue requisito *sine qua non* para pertenecer a esta Congregación que se presenta como Colegio; la pérdida de este requisito suponía, de oficio, la exclusión de la Corporación (13).





Número de miembros de la Congregación de San Lucas							
Año	Congregantes		Año	Congregantes		Año	Congregantes
1654	53 miembros		1661	[43 miembros]		1668	-- miembros
1655	50 miembros		1662	[32 miembros]		1669	[36 miembros]
1656	43 miembros		1663	[34 miembros]		1670	-- miembros
1657	42 miembros		1664	38 miembros		1671	38 miembros
1658	39 miembros		1665	38 miembros		1672	34 miembros
1659	41 miembros		1666	35 miembros		1673	[35 miembros]
1660	[43 miembros]		1667	37 miembros		1674	37 miembros

El número de miembros de la Congregación decrece, progresivamente, desde los 53 iniciales hasta alcanzar una cifra próxima a los cuarenta en la que se mantendrá, con altibajos, en las décadas de 1660, y aún descenderá, aunque siempre por encima de los treinta y cinco, en los comienzos de la década de 1670.

### 3. ORGANIZACIÓN INTERNA

Al frente de la Hermandad queda un diputado mayor, a quien compete la dirección del grupo y cuya firma avala las decisiones asistenciales y profesionales; dos mayordomos se ocupan del cobro de las 'limosnas' con los que los congregantes contribuyen al funcionamiento de la asociación (14); un secretario de actas se ocupa de dar fe de los actos corporativos y dos diputados —denominados desde 1674 'contadores'— controlan el buen funcionamiento

de la Congregación, en particular en lo que a los aspectos económicos concierne. Desde 1656 se hace presente la figura de un tesorero, custodio de los fondos del Colegio; es probable que, con anterioridad, su figura no fuera necesario, pues la Hermandad apenas dispuso de monto económico (15); el alcance de las cuentas, negativo hasta entonces, fue abonado por los propios mayordomos que sirvieron en cada año (16). A partir de 1663 el diputado mayor asume también el rol de tesorero (17).

Las personas que habrían de ocupar los cargos que, anualmente, quedaban encargados de gobernar a la Congregación eran electas el 17 de octubre, víspera de la festividad de san Lucas; las juntas salientes y entrantes se reunían, en un día no determinado, para la justificación económica del año vencido; parece práctica habitual que quienes habían desempeñado los cargos de mayordomos ocuparan los de diputados en la directiva del año posterior.



**Composición de las juntas directivas de la Hermandad de San Lucas [1654-1675]**

	Diputado mayor	Mayordomo primero	Mayordomo segundo	Secretario	Tesorero	Diputado primero	Diputado segundo
1654	Juan de Canseco	Esteban Sánchez de Moya	Juan Criado	Diego Martínez Guerrero		Antonio Sánchez de Mena	Agustín Díez Mercado
1655	Jacinto Sánchez Brizuela	Jaime Merlo	Jerónimo Pérez de Rodrigo	Diego Martínez Guerrero		Esteban Sánchez de Moya	Juan Criado
1656	Santiago Rojo	Agustín Esteban	Onofre Januario	Juan de Bonilla	Jacinto Sánchez Brizuela	Jaime Merlo	Jerónimo Pérez de Rodrigo
1657	Francisco Villayzan	Pedro de Maseda	Pedro Serrano Redondo	Juan de Bonilla	Jacinto Sánchez Brizuela	Agustín Esteban	
1658	Antonio Sánchez de Mena	Juan Sánchez de Mena	Juan de Casa Lafuente		Agustín Esteban	Pedro de Maseda	Pedro Serrano Redondo
1659	Antonio Sánchez de Mena	José Pérez Espuche	Lucas López Moya		Agustín Esteban		
1660	Juan de Bonilla	Jerónimo de la Fuente Izcala [Piérola]	Bernardo Moles	Agustín Díez Mercado	Juan Criado	Esteban Sánchez de Moya	Pedro Aguado
1661		Diego Nicol	Juan Muñoz		Juan Criado		
1662	Jacinto Sánchez de Brizuela	Manuel Bautista de Ocampo	Francisco Ortiz		Juan Criado	Diego Nicol	Juan Muñoz
1663	Agustín Esteban	Francisco Marín	Ventura Díaz de Miranda		Agustín Esteban		
1664	Francisco de Canseco	Juan de Villareal Balboa	Martín de Zicur	Antonio Sánchez de Mena	Francisco de Canseco		Ventura Díaz de Miranda
1665	Francisco de Canseco	Antonio Isnardo de Mora	Francisco Miguel		Francisco de Canseco	Juan de Villareal Balboa	Martín de Zicur
1666		Edmundo Basilio	Jacinto del Ocio				
1667		Baltasar Osset	Domingo Jover			Edmundo Basilio	Jacinto del Ocio
1668	Esteban Sánchez de Moya	Antonio del Ano	Lope Díaz				
1669	Esteban Sánchez de Moya	Francisco Martínez	Juan Díaz Morales				
1670	Agustín Díez Mercado	Juan de Villareal Balboa	Martín de Zicur			Francisco Martínez	José Pérez Espuche
1671	José Pérez Espuche	Juan Sánchez de Mena	Daniel Bartolomé		José Pérez Espuche	Juan de Villareal	Martín de Zicur
1672	José Pérez Espuche	Agustín Esteban	Francisco Ortiz		José Pérez Espuche	Juan Sánchez de Mena	Daniel Bartolomé
1673	Juan Sánchez de Mena	Pedro Manso	Juan Tello de Soria		Juan Sánchez de Mena	Agustín Esteban	Francisco Ortiz
1674	Pedro Serrano Redondo	Lucas López de Moya	Ventura Díaz Miranda			Francisco Canseco	Agustín Díez del Mercado
1675	Juan de Villareal Balboa	Juan Muñoz	Jacinto del Ocio		Juan de Villareal Balboa	Francisco Canseco	Agustín Díez del Mercado



## 4. FIESTAS RELIGIOSAS

La Congregación y Colegio del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación acostumbró a realizar dos fiestas solemnes, en honor de sus respectivos patronos; a estas se suma una tercera, también de carácter plenario, en el día de las ánimas del purgatorio. La Hermandad carecía de sede canónica propia; sus funciones religiosas se celebraban en la iglesia del Convento de San Felipe (18).

Dejamos anotado que una posible causa de la excomunión temporal sufrida por la Hermandad y Cofradía de San Lucas fue una incorrecta diligencia en las formalidades encontradas en los libros de cuentas. Desde su 'reconstitución' en 1654, los libros fueron 'visitados' en dos ocasiones: el 19 de noviembre de 1657 los diligenció H<sup>o</sup>. de la Riva Valdés (19) y 1 de diciembre de 1661, Juan Crisóstomo Pérez Damián (20), ambos encontraron convenientemente dispuesto su contenido. No conocemos 'visitas' posteriores, probablemente no las hubo, ya que el contenido del 'Libro de cuentas' se encuentra sustancialmente alterado -en lo que a su disposición cronológica se refiere- desde 1661 (21).

La Congregación, desde que nos queda noticia de su existencia, celebraba doce misas tras el fallecimiento de uno de sus miembros, o de la esposa de este, por el bien de su alma (22).

## 5. EL GREMIO

No cabe duda de la conciencia gremial con que los cofrades de san Lucas entienden su Hermandad; ellos mismos emplean la denominación de "Diputado Mayor del Colexio de los boticarios de esta Corte" o "Secretario de dicho Colexio" para referirse a su agrupación (23).

De manera independiente a las 'limosnas' de sus cuotas anuales, los boticarios de Madrid se hicieron co-partícipes de los gastos ocasionados por los pleitos y privilegios con los que se reforzaba su posición gremial y su estamento social (24). Lamentablemente no son muchos los datos conservados al respecto, sólo algunas anotaciones al fraccionamiento del pago del que quedaron anotadas las correspondientes cédulas, a modo de 'pagaré', pero que refuerzan la existencia de una estructura orgánica anterior a la que comentamos, y de las que no nos ha llegado testimonio material (25).

Durante los años en que el Colegio de Boticarios dispuso de tesorero es este quien se ocupa de liberar el monto económico necesario para hacer frente a los pleitos y requerimientos formulados ante las autoridades administrativas, tanto económicas como sanitarias.

### 5.1. El pago de alcabala

Los esfuerzos legales de los boticarios por quedar exentos del pago de los impuestos sobre mercaderías es antigua; en la Carta dada por los Reyes Católicos, en Barcelona, el 18 de julio de 1493, extendida a petición de los propios boticarios del Reino para que se les exima de pagar alcabalas por las medicinas, alegan que tienen 'derecho inmemorial' para ello y que, de lo contrario, se causará graves daños a los pobres. Mediante aquella Carta, los Reyes determinaron que sólo se pagaran alcabalas sobre las medicinas simples o los géneros que se vendan en las boticas para los sanos, como las confituras, conservas y productos semejantes, quedando exentos los medicamentos compuestos, por requerir estos de elaboración por parte de los boticarios (26).

En abril de 1590, las Cortes de Castilla, a propuesta de Felipe II, instauraron un nuevo impuesto sobre la alimentación: el 'servicio de millones', inicialmente diseñado como una respuesta temporal para poderse recuperar económicamente del desastre de la Gran Armada; el impuesto consistía en proveer a la Corona de ocho millones de ducados al año por seis años, entre 1590 y 1596, provenientes de una carga fiscal sobre el vino, la carne, el aceite y el vinagre. La temporalidad del impuesto superó, con creces, el sexenio previsto hasta hacerse perenne; gobernando Felipe IV, en 1624 se renovó en las Cortes por valor dos millones de ducados al año, que fue aumentado en 1626 a cuatro millones de ducados al año con nuevas cargas al papel, sal y embarque en puertos.

Los boticarios presentaron, en las Cortes reunidas en Madrid durante 1626, un memorial para que se les retirara la contribución del uno por ciento que se les hacía abonar sobre los medicamentos simples y compuestos para el pago de este 'servicio de millones'; la solicitud había sido presentada, también, al Consejo Real, organismo encargado de su recaudación (27). Los argumentos esgrimidos son los mismos que el gremio defendiera ante los Reyes Católicos en el verano de 1493:

"... no deverse cobrar de las medicinas este derecho por estar exentas y libres de todo pecho y tributo, y que como tales se manda por las leyes del quaderno que no se pague alcavala dellas, y por ser a favor de los hospitales, gente pobre y menesterosa que es la que mas de ordinario padece falta de salud [...] y que el precio que se da por ellas no es por el valor de la materia, sino por la pericia del que las dispone, de que ni se debe alcavala ni ningun derecho, ni es propiamente compra ni venta para que se cobre el uno por ciento..." (28).

Las Cortes de Madrid informaron positivamente el requerimiento de los boticarios: "El Reyno, aviendo visto esta peticion y lo contenido en las condiciones del servicio de millones [...] acordó representar a Su Magestad es conveniente que no se les registre y



que por las razones que en su petición dicen, se consultase a Su Magestad para que se sirviese de mandar no se pague el uno por ciento de las medicinas compuestas... " (29).

Pese a estas disposiciones, en 1656 se suscitó un pleito ante la Real Hacienda, promovido por el fiscal Antonio de Seloaga, por el que se obligaba a la Corporación al pago de alcabala y un dos por ciento de las medicinas elaboradas (30).

En respuesta a ello, en los inicios del julio de 1656 (03/07), buena parte de los boticarios de la Corte se reunieron en el convento de San Felipe el Real, ubicado en la calle Mayor, próximo a la Puerta del Sol, para otorgar un poder de representación del colectivo en favor del procurador Paulino Benito (31). Pocos días después (18/07/1656) este procurador presentará, en nombre de los "Boticarios de esta Corte" un recordatorio de las resoluciones de 1623 y 1629 sobre diferentes consultas realizadas a las Cortes, en las que se les liberaba a los boticarios del pago del impuesto (32). Los argumentos esgrimidos por el procurador nos son bien conocidos:

"Porque mis partes [los boticarios de Madrid] no benden en sus boticas simples ni compuestos algunos que no sean para enfermos y que mis partes no los ayan dispuesto y confeccionados de suerte que puedan servir a la curación de las enfermedades y regetandolo los medicos sin que bendan otro Genero de mercadería alguna de que puedan dever alcavala conforme a las leyes del reyno [...] se bendan baratas para que puedan aprovecharse dellas los enfermos siendo la gente Pobre y menesterosa la que mas de hordinario padeçe falta de salud y rrespecto de que el precio que se da por las medicinas no es por el balor de la materia de que se compone sino por la disposicion, trabajo y ocupación de mis partes [...] por diferentes autos de el consejo r<sup>l</sup> de Castilla bençieron el que no se les hiciesen Repartimientos, como los demás gremios y últimamente rrepresentaron mis partes a V.A. la gracia que se les havia en quererlos comprender con los dichos rrepartimientos con los dichos gremios de los oficios mecánicos siendo el arte de la botica favorecido por leyes del rreino y conozido por todo derecho por ser dependiente de la medicina y que penden del los principales medios con que ella ôbra y los médicos la exercen y el conocimiento de la Filosofia natural de la plantas drogas y demás ingredientes se sirvió VA declarar que la ôcupacion de mis partes es arte científica y que deven gozar de todas las onrras preeminencias y prerrogativas que pueden tocar y pertenecer â la çienciã y facultad de la medicina..." (33).

Su escrito tuvo contestación a través del procurador Marcos Antonio de Molina, fechado un año después (09/08/1657), en el que se recoge al agravio mostrado por otras corporaciones: la de mercaderes de sedas y de libreros, entre ellas (34).

El pleito entrará en una compleja senda burocrática que obligará a nombrar un nuevo procurador en el otoño de 1657 (05/10), el elegido será Juan de Chaves. La conclusión del litigio iniciado en el verano de 1656 no finalizará hasta 1659, y hasta la primavera de 1663 no se extenderá la ejecutoria a favor de los boticarios de la Corte (35).

El pleito se siguió en el Real Consejo de Hacienda a instancias de los diputados de rentas de la Villa de Madrid; también se contendió con el fiscal del Real Consejo (36). Tras volver a argumentar "el derecho notorio que los Boticarios tenemos adquirido para no deber pagar alcavala, ni se nos puede repartir ni cobrar, porque de todos los medicamentos que vendemos, que todos son compuestos y ni simples, estamos eximidos y liberados...", Juan de Chaves solicitó, en la primavera de 1658 (23/05), la nulidad del repartimiento, a lo que el procurador Cosme de Miranda, en nombre de Domingo Sanz de Biteri y Thomás Sánchez, diputados de rentas, responde que

"...tales Diputados, les an hecho y hacen repartimientos tan moderados, respecto solamente de las cosas y medicinas simples, que por Leyes del Reino esta dispuesto deben pagar dichos Boticarios, y por tener como tienen sus tiendas y Boticas abiertas como otros mercaderes, que venden y benefician sus géneros, y Gremio tan conocido y notorio se les hacen dichos repartimientos goçando del beneficio y conveniencia del encauçamiento general [...] porque dichos repartimientos no lo hacen mis Partes por razón de las confecciones y medicinas compuestas, que por su arte o industria componen dichos Boticarios para remedio de las enfermedades..." (37).

En el verano de 1658 (13/08), el auto pasará al marqués de Casares [Martín de Arrese Girón], Corregidor de la Villa, quien otorgó a las partes nueve días para presentar la documentación pertinente; un par de meses después, a fines del noviembre de 1658 (26/11) se dictó sentencia, en ella se establece "no deber los dichos Boticarios pagar alcabala de los géneros que llaman simples y venden en sus Boticas, por quanto son para la curación de enfermos..." (38). La sentencia fue confirmada por ambas partes en Madrid, en marzo de 1659 (03/03) y de ella se da traslado, semanas después (26/03/1659), por solicitud de los boticarios de la Corte:

"... hordenamos y mandamos, que las cosas compuestas que los Boticarios benden para salud de las jentes que están dolientes, que son las siguientes: confuccionen delectables, como son, assi como dejer mis alquermes, y otros confecciones amargas, así como triferas y atriacas, y otras cosas semejantes, y otras medicinas que se dicen conditos, que son de açucar y beolado y jengibre en conservas, y otras cosas, y las medicinas para todo mal de pedios, y jarabes y arropeociones, infusiones y trociscos, y polvos compuestos



y píldoras y ungüentos y emplastos y aceites y aguas de alquitaras y pítimas y embrocas y saquillos y gargarismos y otras semejantes cosas que los físicos mandan por medicinas a los dolientes y enfermos, que de estos tales, así por el trabajo que los dichos Boticarios reciben en lo facer y componer y sacar y buscar por el bien general de todos nuestros súbditos, e porque no se encarezcan, que no se pague la dicha alcabala. Por si los dichos Boticarios vendiesen confites de qualquier manera, o de acitrón, o botes de conserva u otras semejantes cosas que se suelen dar a sanos, que estas tales cosas y de otras semejantes y medicinas simples que bendiesen, paguen libremente la alcabala... (39).

En realidad, la reafirmación de la Carta dada por los Reyes Católicos, en Barcelona, el 18 de julio de 1493, donde ya se determinó que los boticarios sólo pagaran alcabalas sobre los géneros que se vendieran en las boticas para los sanos (26).

## 5.2. El impuesto de guerra: las tasas sobre 'soldados'

El movimiento secesionista catalán de 1626, motivado por la negativa del Principado a colaborar con las pretensiones económicas del conde-duque de Olivares con destino a las tropas españolas que habrían de participar en las guerras europeas, motivó una fuerte leva de soldados en el resto del territorio sometido a la Corona, de la que no estuvo exenta la Villa y Corte.

El gremio de boticarios madrileños estuvo llamado, en 1635, a colaborar con las pretensiones del valido de Felipe IV; de su actuación nos queda testimonio a través del pleito protocolizado por Juan Gómez Hidalgo (40), es esta una de las más antiguas actuaciones gremiales de este colectivo que ha llegado hasta nosotros.

Ante las solicitudes del segundo conde de La Revilla [Pedro Fernández de Velasco y Velasco (1580-1636)], Corregidor de Madrid, tres boticarios de la Villa y Corte: Gregorio González (fl. 1632-1658), Diego de Cortavila (ca. 1570-1657) y Martín de la Vega (fl. 1632-1635), se aprestaron a correr con el gasto que suponía contribuir con tres soldados al reclutamiento ordenado desde la Corona y compartir los costes con el resto del gremio (41). Su actuación levantó la polémica dentro del colectivo, no tanto por el peso de la contribución o su conveniencia, sino por el modo en que esta se había llevado a efecto.

En contra de esta actitud complaciente, otros cuatro boticarios madrileños: Diego de Villaizan (fl. 1618-1644), Pedro Gutiérrez de Arévalo (fl. 1604-m. 1656), Diego Fernández de Riofrío (fl. 1632-1635) y Gabriel de Bonilla (fl. 1635-1636) "por nosotros mismos, y en virtud del poder que tenemos de los demas Boticarios desta Corte", elevaron una solicitud al Rey para que tomara en consideración su subordinación al Real Tribunal del Protomedicato y, por tanto, la falta de competencia del Corregidor de Madrid para determinar su participación en la distribución de la leva de soldados con la habría de contribuir la ciudad a las peticiones del Monarca (42).

El asunto pasó a la jurisdicción del Consejo Real (43); ante él volvieron a exponer sus quejas la comisión encabezada por Diego de Villaizan en representación de los boticarios madrileños (44). Tras oír a los representantes municipales (45), el Consejo Real sentenció:

"Que el ejercicio de Boticario es profesio[n], y Arte cientifica, y como tales se examina[n] en el Protomedicato: y assi no podía, ni pudo el dicho Corregidor repartirlos como a oficiales mecanicos el dicho numero de soldados..." (46).

La solución del pleito, claramente favorable a la propuesta de los boticarios liderados por Diego de Villaizan, incluía una recriminación del Consejo Real ante los boticarios que acataron la disposición del Corregidor de la Villa (47); no obstante, requirió acudir al bolsillo de los boticarios: los tres soldados pactados con el Corregidor de Madrid se convirtieron en cinco en las negociaciones con el Consejo Real (48), fue el pago a su reconocimiento como 'Arte científica'.

El trato consolidado entre los representantes de los boticarios madrileños y el Consejo Real no fue respetado, en 1636, por el nuevo Corregidor de la Villa, el primer conde de Montalvo [Juan de Castro y Castilla (ca. 1585-post. 1643)]; este volvió a solicitar la colaboración económica para el mantenimiento de las levas a Gregorio González, Diego de Cortavila y Martín de la Vega; ante su impago, decretó la puesta en prisión de los tres boticarios (49).

El asunto pasó de nuevo a la mesa del Consejo Real; esta vez no actuaron los boticarios sino sus representantes legales: Bartolomé Fernández en representación de Gregorio González, Diego de Cortavila y Martín de la Vega (50), y Felipe de Cuéllar Saavedra, "en nombre de los Boticarios desta Corte" (51). El Auto de la Sala de Gobierno remite al ya fijado en ocasiones anteriores (52), aconsejando la intermediación de Juan Cazador (fl. 1610-1641), Boticario mayor de la Real Casa, para el reparto del coste de la leva entre los boticarios madrileños (53).

Las negociaciones emprendidas, en 1636, por los boticarios ante el Consejo Real habrían de ser nuevamente favorables al colectivo, pero tuvieron su precio: el mantenimiento de un sexto soldado para las tropas de la Corona (54).

Aún en el verano de 1658, ante el asedio sufrido por la ciudad de Badajoz durante la Guerra de Restauración portuguesa, la villa de Madrid volvió a solicitar, de los boticarios establecidos en ella, su contribución económica para dotar de nuevos soldados al Ejército de Extremadura; entonces bastó la presentación del privilegio aludido para que la solicitud quedara anulada (55).

## 5.3. Farmacia: 'arte científico'

Las representaciones presentadas ante las Cortes y el Consejo Real por los boticarios madrileños, tanto manifestando su independencia del Corregidor de la Villa en materia de levas para los Ejércitos del Rey, como para el pago de la alcabala por las medicinas compuestas, tienen un mismo cariz: su dependencia jurisdiccional





del Protomedicato, al ser su trabajo profesión sanitaria y no un mero trabajo manual.

Los reconocimientos a las pretensiones de los boticarios madrileños, manifestados tanto por las Cortes reunidas en Madrid en 1626 (56) como por el Consejo Real en sus Autos de 1635 y 1636, señalan, en ocasiones de manera explícita, el carácter de 'Arte científica' de la profesión. Una declaración regia en tal sentido ahorraría pleitos y podría ser esgrimida por el colectivo en situaciones donde se cuestionara el carácter sanitario de su profesión.

Así debieron entenderlo Pedro Gutiérrez de Arévalo (*fl.* 1604-m. 1656), Pedro de Chaves (*fl.* 1632-1650), Juan de Montalvo (*fl.* 1632-1650) y Roque González (*fl.* 1632-1650) quienes, en nombre del colectivo gremial, elevaron un escrito a Felipe IV solicitando la exención del pago de la tasa de alcabala (57).

El 13 de marzo de 1650, Felipe IV firma, en Madrid, una Real Cédula en la que se hace patente la exclusión del gremio de los boticarios de Madrid de aquellos impuestos propios de los trabajadores manuales (58):

"Por quanto por parte de vos los Voticarios de la Villa de Madrid por vosotros mismos y los que en adelante fueren en ella me ha sido hecha Relacion que en las concesiones, contribuciones y repartimientos que se han hecho reputando este arte por oficio mecanico os pusieron en el Gremio y lugar que a los demas oficios a cuyo agravio os ópusisteis con eficaces fundamentos y habiendo probado V<sup>ra</sup> exemption prerrogativa y procedencia obtuvisteis en contradictorio Juicio que no pagaredes Uno por ciento de los bendible y que el mi corregidor de la d<sup>ha</sup> Villa no os repartiese soldados como a los demas Gremios y habiendo mandado y guardar este por diferente auto de mi Consejo y dados por Juez particular a un Ministro del para que os defendiese y amparase en ello no siendo todo esto vastante para dejar de padezer grandes molestias y vejaciones costas y menoscabos de v<sup>do</sup> credito y hacienda que os han hecho los mis corregidores de la d<sup>ha</sup> Villa y siendo constante, que nunca haveis pretendido eximiros de acudir vibamente y toda v<sup>ra</sup> Voluntad y fuerza a mi servicio en ocasiones tan precisas y con tantos titulos justificadas y es prueba desto que siempre habeis hecho dentro de los limites de v<sup>ro</sup> caudal y excediendo a veces del y de lo posible [...] que es notorio haveys reparado y hecho sentimiento y justa queja que os quieran asociar con los oficios mecanicos siendo el V<sup>do</sup> arte favorecido por las leyes destos Reynos reconocido por todo derecho y acaparado por ellas por dependientes de la medicina y que de v<sup>ro</sup> arte penden los principales medios con que obra ella y los medicos que la exercen de donde pende tambien el conocimiento de la filosofia natural de las plantas drogas y demas ingredientes que han de obrar en consecución de la salud asi los simples como los compuestos que como parte yntegral de la medicina estais subgetos al protomedicato por que el os examina y visita, y apartados y segregados deste tribunal se os hace mucho agravio asi a vosotros como

al la misma medicina. Supp<sup>me</sup>. que para que cesen todas estas molestias y vejaciones y de una vez recivais el credito y reputacion de mi Grandeza [...] sea servido de eximiros y sacaros de la jurisdiccion del dicho mi corregidor declarando que es arte este ejercicio y que debe goçar de las preeminencias que les competen, mandadno que los mis corregidores que aora son ó adelante fueren de la d<sup>ha</sup> Villa de Madrid ni sus thenientes en los d<sup>hos</sup> oficios ni otros just<sup>a</sup> algunas agora ni en ningun tiempo perpetua mente para siempre jamas no os hagan repartimiento alguno y que si le tubieren hecho le tilden y vorren agregando a los profesores desta arte el tribunal del mi protomedicato para que quando el me hiciese algun servicio entonces y no de otra manera le ayais de hacer vosotros y los voticarios que adelante ubiere en la dicha Villa en la forma y como los demas medicos lo hicieren sin estar en otro ningun tiempo dependientes de otro tribunal dandoos privilegio en forma dello con las fuerzas, clausulas y firmezas que fueren necesarias para su execucion y cumplimiento o como la mi Mr<sup>c</sup>. fuese [...] declaro que el exercicio de los dichos voticarios como dependiente de la medicina y de quien tambien dependen los principales medicos con que obra ella y los medicos que la exerçen, es arte cientifica, y como arte cientifica, quiero y es mi voluntad que desde luego ayais de goçar y gocéis de las honrras preeminencias y prerrogativas que os competen, tocan y pertenecen y puedan tocar y pertenecer en qualquier manera a la ciencia y facultad de la medicina conforme a las leyes destos mis Reinos..." (59).

La expedición del privilegio llevó anejo el pago de una merced; la media anata se fijo en 7.500 ms, pagaderos en períodos de quince años (60). Pocos meses después de expedido, el documento fue presentado ante el vizconde de Laguna [Luis Jerónimo de Contreras y Velázquez de Cuéllar (*ca.* 1600-*ca.* 1670)], Corregidor de Madrid, y ante Rodrigo Gómez de Rozas (1591-*ca.* 1666), Regidor de la Villa y comisionado para el servicio de milicia, ante quienes se hicieron valer los derechos adquiridos (61).

Estos no se hicieron efectivos de inmediato y, aún en 1656, Paulino Benito, en nombre de los boticarios de Madrid, hubo de requerir el que se les relevase de pagar una contribución de la que estaban exentos (62).

Del uso del privilegio de la consideración de la farmacia como 'arte científica' fuera de los dominios de la ciudad de Madrid da cuenta, en la primavera de 1657, la participación de Jacinto Sánchez de Brizuela (*fl.* 1654-1674), entonces tesorero de la Congregación de boticarios de Madrid, en el pleito mantenido por el Cabildo de jurados de Toledo contra Pedro Cid, boticario de aquella ciudad "de admitirle el uso y ejercicio del oficio de jurado" a lo que tal cabildo se negaba en razón de su oficio de boticario; la razón esgrimida por la corporación madrileña fue "... q<sup>e</sup> [la farmacia] no se podia llamar tienda antes es Ciencia de medicina..." (63).

#### 5.4. Los cargos públicos

Ya en las Cortes reunidas, en Valladolid, en 1548, los procurados plantearon a Carlos I la conveniencia de que los boticarios quedaran exentos de aquellas cargas municipales que les obligaran a ausentarse de las boticas, basándose en la necesidad de que los medicamentos fueran preparados por manos profesionales y no por otras (64). El monarca transfirió la solución del asunto a las autoridades municipales "Las Justicias en sus jurisdicciones provean lo que convinere" (65).

Volvió a suscitarse el problema en el reinado de Carlos II, en el otoño de 1689 llegó al Consejo Real el pleito entre los boticarios de Salamanca y los sesmeros y procuradores del común de la ciudad; tras su dictamen se hizo extensivo a todos los boticarios del Reino la exención a estos de los cargos municipales que requieran de su asistencia (66).

No obstante, algunos boticarios madrileños fueron electos como cargos públicos, a requerimiento propio; es el caso de Jacinto Sánchez de Brizuela, boticario y familiar del Santo Oficio, electo por fiel de la Villa de Madrid, en 1667, dentro del ámbito territorial de la parroquia de san Salvador (67).

#### 5.5. La limitación de establecimientos

De abril de 1658 data una pretensión, elevada al Real Tribunal del Protomedicato, mediante la cual los boticarios madrileños solicitaron una limitación del número de boticas establecidas en la Corte, de la que sólo nos queda el testimonio de haberse iniciado el pleito:

"... [343 rs] por el pleyto de la pretensión que hubo en el protomedicato sobre que no se pusiese ninguna botica de nuevo sino que antes de las que fuesen bacando se consumiesen asta quedasen asta cierto numero como parecio por una memoria que presento de dichos gastos, cuyo pleito esta en poder de Juan Garcia Albertos escribano del protomedicato y esto se le paso en cuenta por aber el señor Antonio Sanchez de Mena y demas oficiales juntados en su cassa para formar acuerdo y tomar Resolucion de si conbenia o no acerlo y esto lo determinaron en primero de abril de seis<sup>os</sup> y cinq<sup>ta</sup> y ocho años" (68).

### 6. LA ECONOMÍA

Los ingresos de la Congregación quedan reducidos a las 'limosnas' que los congregantes aportan, anualmente, a la Hermandad y una contribución de entrada (69); ocasionalmente se anotan algunas donaciones especiales, bien para un fin concreto (70) bien para los propósitos generales de la agrupación.

Los congregantes no estuvieron fácilmente predispuestos al pago de sus cuotas, lo que dificultó el trabajo de los mayordomos quienes, en no pocas ocasiones, cargaron con buena parte de la responsabilidad económica de sus compañeros (71). La situación llegó, en 1656, al extremo de consultar a un abogado sobre la posibilidad de recurrir a la justicia para obligar a los colegiales a abonar sus cuotas (72).

La celebración pública de las fiestas religiosas de la Congregación suponen el monto más alto de sus gastos; las velas, la música, el adorno y limpieza del lugar de celebración consumen un alto coste que la propia Congregación supo regular, a partir de 1655, fijando una cantidad máxima para ello (73).

Desde 1660 la Congregación atraviesa una vida lánguida, limitada a la celebración de los actos litúrgicos dentro del parco presupuesto a ellos asignados; entró en crisis en 1668 (74), los intentos de superación realizados en los comienzos de la década de 1670 no llegaron a buen puerto y la Hermandad entró en un período de hibernación, del que no despertará hasta los comienzos del XVIII (75).

No fue esta una Congregación rica; ya dejamos señalado que no disponían de sede propia y su ajuar -hasta donde nos es conocido- nos proclama su parca dotación (84).

Los gastos realizados durante los últimos años de la década de 1650 superan a los ingresos habidos por la Corporación; estos fueron asumidos por los mayordomos. Desde los comienzos de la década de 1660, el balance económico siempre fue positivo para la Congregación; la documentación nos remite a la entrega, por los mayordomos correspondientes a cada año, de vales firmados que quedan en poder del tesorero -o de quien realizara sus funciones-; no parece que estos pagarés fueran cobrados; en cualquier caso, tanto las entradas como las salidas parecen bastante próximas.

### 7. CODA

Desde 1660 la Congregación atraviesa una vida lánguida, limitada a la celebración de los actos litúrgicos dentro del parco presupuesto a ellos asignados; entró en crisis en 1668, los intentos de superación realizados en los comienzos de la década de 1670 no llegaron a buen puerto y la Hermandad entra en un período de hibernación, del que no despertará hasta los comienzos del XVIII.

En enero de 1700, un grupo de boticarios madrileños, algunos ligados al servicio de la Real Botica (85), recuperaron la antigua estructura de la Congregación y Colegio de San Lucas y promovieron una 'refundación' de la Corporación; contaron para ello con apenas una decena de los antiguos congregantes (86), pero dispusieron del apoyo de un amplio grupo de boticarios interesados en volver a consolidar una estructura gremial.

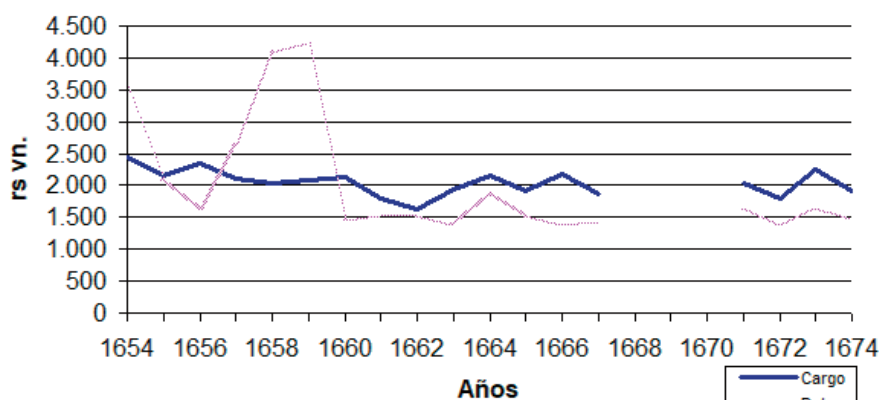


Gastos de la Congregación de San Lucas					
	Religiosos (76)	Asistenciales (77)	Gremiales (78)	Otros (79)	Total
1654	3.493 rs.	24 rs.	36 rs.	00 rs.	3.553 rs.
1655	2.079 rs.	24 rs.	00 rs.	00 rs.	2.103 rs.
1656	1.611 rs.	00 rs.	12 rs.	00 rs.	1.623 rs.
1657	1.742 rs.	18 rs.	867 rs.	00 rs.	2.627 rs.
165880	2.153 rs.	12 rs.	1.920 rs.	00 rs.	4.085 rs.
165981	2.172 rs.	58 rs.	1.920 rs.	86 rs.	4.236 rs.
166082	1.400 rs.	00 rs.	52 rs.	00 rs.	1.452 rs.
1661	1.458 rs.	37 rs.	28 rs.	00 rs.	1.523 rs.
1662	1.520 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.520 rs.
1663	1.400 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.400 rs.
166483	1.424 rs.	00 rs.	00 rs.	424 rs.	1.848 rs.
1665	1.520 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.520 rs.
1666	1.400 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.400 rs.
1667	1.448 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.448 rs.
1668	---	---	---	---	---
1669	1.767 rs.	00 rs.	00 rs.	48 rs.	1.815 rs.
1670	---	---	---	---	---
1671	1.544 rs.	110 rs.	00 rs.	00 rs.	1.654 rs.
1672	1.400 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.400 rs.
1673	1.644 rs.	00 rs.	00 rs.	00 rs.	1.644 rs.
1674	1.472 rs.			14 rs.	1.486 rs.

Gastos de la Congregación de San Lucas						
	1654	1655	1656	1657	1658	1659
Religiosos	3.493 rs.	2.079 rs.	1.611 rs.	1.742 rs.	2.153 rs.	2.172 rs.
Asistenciales	24 rs.	24 rs.	--	18 rs.	12 rs.	58 rs.
Gremiales	36 rs.	--	12 rs.	867 rs.	1.920 rs.	1.920 rs.
Otros	--	--	--	--	--	86 rs.
Total	3.553 rs.	2.103 rs.	1.623 rs.	2.627 rs.	4.085 rs.	4.236 rs.
	1660	1661	1662	1663	1664	1665
Religiosos	1.400 rs.	1.458 rs.	1.520 rs.	1.400 rs.	1.424 rs.	1.520 rs.
Asistenciales	--	37 rs.	--	--	--	--
Gremiales	52 rs.	28 rs.	--	--	--	--
Otros	--	--	--	--	424 rs.	--
Total	1.452 rs.	1.523 rs.	1.520 rs.	1.400 rs.	1.848 rs.	1.520 rs.
	1666	1667	1668	1669	1670	1671
Religiosos	1.400 rs.	1.448 rs.	--	1.767 rs.	--	1.544 rs.
Asistenciales	--	--	--	--	--	110 rs.
Gremiales	--	--	--	48 rs.	--	--
Total	1.400 rs.	1.448 rs.	--	1.815 rs.	--	1.654 rs.
	1672	1673	1674			
Religiosos	1.400 rs.	1.644 rs.	1.472 rs.			
Asistenciales	--	--	--			
Gremiales	--	--	14 rs.			
Total	1.400 rs.	1.644 rs.	1.486 rs.			

### Balance económico de la Congregación de San Lucas (1654-1674)



Balance económico de la Congregación de San Lucas

	Cargo	Data	Alcance			Cargo	Data	Alcance
1654	2.451 rs.	3.553 rs.	- 1.102 rs.		1655	2.146 rs.	2.103 rs.	43 rs.
1656	2.355 rs.	1.623 rs.	732 rs.		1657	2.112 rs.	2.627 rs.	- 515 rs.
1658	2.028 rs.	4.085 rs.	-2.057 rs.		1659	2.088 rs.	4.236 rs.	- 2.148 rs.
1660	2.132 rs.	1.452 rs.	680 rs.		1661	1.802 rs.	1.523 rs.	279 rs.
1662	1.632 rs.	1.520 rs.	112 rs.		1663	1.931 rs.	1.400 rs.	631 rs.
1664	2.162 rs.	1.888 rs.	274 rs.		1665	1.924 rs.	1.520 rs.	404 rs.
1666	2.177 rs.	1.400 rs.	777 rs.		1667	1.872 rs.	1.448 rs.	424 rs.
1668	---	---	---		1669	1.941 rs.	1.815 rs.	126 rs.
1670	---	---	54 rs.		1671	2.033 rs.	1.654 rs.	379 rs.
1672	1.796 rs.	1.400 rs.	396 rs.		1673	2.252 rs.	1.644 rs.	608 rs.
1674	1.924 rs.	1.486 rs.	438 rs.					

## 8. REFERENCIAS

1. Libro de la Congregación y Colegio de El Señor San Lucas y Nuestra Señora de la purificación nuevamente instituido por los Boticarios de esta Vª de Madrid, Corte de El Rey Don Phelipe Nuestro Sr. segundo, de este Nombre y Confirmado por el Ilmo Sr. Dn Gaspar de Quiroga. Cardenal en la Sta. Iglesia de Roma. Arzobispo de Toledo, Ettº en diez y seis dias del mes de Noviembre de Mill y quinientos y ochenta y nueve años. Manuscrito, 100 fol. (ARANF, L-1). El término 'nuevamente' ha de interpretarse como lo hace el primer 'Diccionario de autoridades': "De poco tiempo á esta parte, o con novedad" (cf. Academia Española. Diccionario de la lengua castellana, en que se explica el verdadero sentido de las voces... con las frases o modos de hablar, los proverbios o refranes y otras cosas convenientes al uso de la lengua... En Madrid: en la imprenta de Francisco del Hierro, 1726-1739. 6 vols. —cf. vol. 4: 689. 1734-).
2. Gaspar de Quiroga ocupó el Arzobispado de Toledo desde 1577 hasta su fallecimiento; su nombramiento como cardenal tuvo lugar en 1578 (Fernández Giménez C. Problemas del Consejo de la Inquisición en el reinado de Felipe II. Revista de la Inquisición 2001; 10: 193-211).
3. Así se desprende de la documentación que nos ha llegado: "En este año han continuado los oficios de la Congregación en la misma conformidad que en el año Passado como Pareze del libro del Secretario donde se nota lo determinado en las Juntas. . ." (Cargo del tesorero Francisco Martínez para el año de 1701. ARANF, L-1, fol. 53r).
4. "En la villa de Madrid. En diez y nueve dias de el mes de Diziembre de mill y seiscientos y cinquenta y quatro años. Se juntaron los señores Juan de Canseco Diputado mayor de la Congregación, Antonio Sanchez de Mena y Agustín de Mercado Diputados que fueron el año passado hasta diez y siete de octubre de este presente año, y Jacinto Sanchez Diputado Mayor, y Jaime Merlo y Jerónimo Perez



de Rodrigo Mayordomos nombrados por la Congregación para este presente año hasta diez y siete de octubre de mil y seiscientos y cincuenta y cinco. A tomar las cuentas a los señores Esteban Sanchez de Moya y Juan Criado Mayordomos que fueron el año pasado hasta diez y siete de octubre de mill y seiscientos y cincuenta y quatro años. Las quales se tomaron ante mi Diego Martinez Guerrero Scribano de dicha congregación en la forma y manera siguiente. . .” (ARANF, L-1, fol. 4r-7r).

5. Justificación de gastos [19/12/1654] (ARANF, L-1, fol. 4r-7r).
6. En estas fechas, entre 1647 y 1665, ocupaba el título de conde de Chinchón el quinto de tal condado: Francisco Fausto Fernández de Cabrera y Bobadilla (1629-1665).
7. “. . . y por aver visto los Boticarios desta Corte estas razones [sobre la cantidad de jugo de limón que debe añadirse a la composición de jacintos napolitana], y las demas que pudo obligarles a ello, avrá treinta años que aquellos doctisimos Boticarios, que entonces eran de la nobilissima Congregacion delllos, acordaron, que se pudiesen en esta composicion dos onças de polvos por cada libra de jaraves de limones, y assi lo firmaron en el libro de sus juntas, y la experiencia desde aquellos tiempos hasta agora ha enseñado, consiguiendolo con esta cantidad, con quan buen cuerpo queda. . .” (Gutiérrez de Arévalo P. *Practica de boticarios, guia de enfermeros, remedios para pobres*. . . En Madrid: por María de Quiñones, 1634. *cf.* fol. 25r-25v).
8. “Philemon creyó ser [el succino] mineral fossile esse dixit, y de verdad no lo erró, quando lo manifiestan dos pedacicos que hemos mostrado a los Boticarios congregantes de esta Corte, cuyo modo de substa[n]cia es liviana. . .” (Fuente Pierola J. *Tyrocinio Pharmacopeo methodo medico, y chimico en el qual se contienen los canones de Ioannes Mesue Damasceno, y su explicacion*. . . Madrid: Diego Diaz de la Carrera, 1660. —*cf.* p. 220-).
9. “. . . se note hazemos reparo en su dezir, que algunos Boticarios doctos de Madrid, y Granada, donde él [Ambrosio Ximénez] ha practicado, se valen de la melisa [. . .] que en Granada viesse se ayan valido, pudo ser, aunque en duda lo ponemos; pero en Madrid, dize, los aya visto, perdonenos la autoridad de Visitador, comprada de boticas, que no se la passamos, ni es permitido [. . .] ni jamas se ha movido semejante question, como se conoce por los libros de la noble Congregacion de los doctos, prudentes, y sabios Boticarios y no es dubitable, que si algun Boticario huviera propuesto semejante duda, todos supieran Della, y en alguna junta de las que hazen al año, se huviera ventilado, y resuelto, dando noticia della al Sansegundo, y Real Protomedicato, para que como juez determinasse, ordenasse, y mandasse, declarando el substituto que se devia poner por el doronico, como assimismo declaró, y mando, que por Galia absolutamente pedida, se ponga la moscata . . .” (Fuente Pierola J. *Resumen per oratorio a la satisfaccion apologica y discurso diaphoretico, en la question que responde de quid pro doronico legitimo*. . . [Madrid: s.i.], 1669 —*cf.* fol. [1r-1v]).
10. Barrio Moya J.L. Don Pedro Barba, médico palentino del rey Felipe IV. Aportación documental. Publicaciones de la Institución Tello Téllez de Meneses 2006; 77: 385-406.
11. Fuente Pierola J. Resumen per oratorio a la satisfaccion apologica y discurso diaphoretico, en la question que responde de quid pro doronico legitimo. . . [Madrid: s.i.], 1669 (*cf.* fol. [1v]).
12. En las cuentas tomadas a Agustín Esteban, tesorero, el 14/03/1660 (ARANF, L-1, fol. 17r-19r), se anota una data de 220 rs procedentes de un repartimiento para seguir el pleito de la alcabala y dos por ciento “a los que no eran congregantes”. En las correspondientes a 1664 queda constancia de las limosnas por valor de 193 rs “que assi mismo es Boticario aunque no son congregantes estos referidos” (Justificación de gastos [10/01/1665]. ARANF, L-1, fol. 37r-38r). Y en el balance económico realizado en 1671, se lee: “Y mas se les hace cargo de cinquenta y siete reales que cobraron de tres boticarios que no son Congregantes y dieron de su donacion” (Justificación de gastos [25/01/1672]. ARANF, L-1, fol. 20r-30r); en iguales términos, en el balance de 1673 figuran, como ingreso, 149 rs “. . . los que recibieron de los demas SS<sup>es</sup>. Boticarios desta Corte que no son congregantes que acuden con su limosna a esta Santa Congreg<sup>n</sup>.” (Justificación de gastos [24/01/1674]. ARANF, L-1, fol. 31r-32r).
13. Por ello, en las anotaciones económicas correspondientes a 1664, se anota como débito, los 35 rs que “dejaron de cobrar de Juan de Ruy [Ruiz] Díaz por el tiempo correspondiente de la cantidad que faltó por haver dejado la botica” (Justificación de gastos [10/01/1665]. ARANF, L-1, fol. 37r-38r). Y en el balance de 1665 se anotan: “Mas da en data zinquenta y dos Rs que no cobro de Joseph Rodríguez por aver vendido la Botica” (Justificación de gastos [07/11/1667]. ARANF, L-1, fol. 38v-39v).
14. Compete a ellos, también, la custodia de los bienes materiales de la Congregación; “. . . y assi mismo se acordo los señores mayordomos que al presente son se hagan cargo del estandarte del Sr. Sn Lucas cortinas y las demas alajas que pareciese ser de la Congregación conforme al inventario que hiziese” (Anotación de gastos [29/01/1664]. ARANF, L-1, fol. 36v).
15. Cuando, en 1655, las cuentas finales generaran un pequeño supe-rávit, este fue entregado a Onofre Januario, mayordomo para 1656 (Justificación de gastos [22/11/1655]. ARANF, L-1, fol. 8r-9v).
16. Los 1.102 rs de alcance negativo que sufrió la Congregación en 1654 fueron abonados por Juan Criado, que aportó 854 rs y Esteban de Moya, que hizo gracia de los 248 rs restantes (Justificación de gastos [19/12/1654]. ARANF, L-1, fol. 4r-7r); una situación similar se vivió al rendir las cuentas del año 1657; entonces resultó un alcance negativo por valor de 664 rs; Pedro Serrano aportó 400 rs (entregó 200 rs en metálico y los otros 200 rs en carta de pago), y de los 264 rs restantes se hizo cargo Pedro de Maseda ‘y estos los





- debe a la Congregación' (Justificación de gastos [12/11/1657]. ARANF, L-1, fol. 13r-13v).
17. Es posible que fuera práctica anterior; no han llegado hasta nosotros el nombre del congregante que se ocupó de la tesorería durante 1662.
18. Al Padre sacristán mayor de San Felipe se le abonan "Los doce ducados que la congregacion da al convento en cada un año..." Justificación de gastos [19/12/1654] (ARANF, L-1, fol. 4r-7r). Anotaciones similares se extenderán hasta el inicio del siglo XVIII.
19. "En la V<sup>a</sup> de M<sup>d</sup>. A Diez y nueve de Noviembre de Mill Seis y Cinqu<sup>a</sup> y Siete estando en Visita General en la parroquial de s<sup>ta</sup> Cruz de esta d<sup>ha</sup> villa el sr Iz<sup>do</sup> Don H<sup>o</sup> de la Riva Valdes Visor Della, vissitó este libro q<sup>e</sup> es del Colexio y Congregación de s<sup>n</sup> Lucas y n<sup>a</sup> sra de la purificacion sita al presse<sup>te</sup> en el Convento de s<sup>n</sup> Phelipe desta villa de la qual son Congregantes los boticarios desta dha v<sup>a</sup> y alló q<sup>e</sup> estan tomadas las quantas hasta octubre del año passado de seiscientos y cinq<sup>ta</sup> y seis y los d<sup>hos</sup> Congregantes qe no tienen rentas ningunas mas de las limosnas qe entre ellos pagan para las fiestas q<sup>e</sup> tienen obligacion de la advocacion de los santos [...] Y mando a los d<sup>hos</sup> Congregantes guarden en todo y punto a las ordenanzas de la d<sup>ha</sup> Congregación. Y asi lo mando y firmo..." Visita de 1657 (ARANF, L-1, fol. 12v).
20. "... vissito este libro de quantas del Colexio y Congregacion de n<sup>a</sup> s<sup>ta</sup> de la Purificaz<sup>n</sup> y S<sup>r</sup>. S<sup>n</sup> Lucas sita al presente en el Combento de San Ph<sup>e</sup> de quien son congregantes los voticarios de esta Corte. Y hallo estan tomadas las quantas a los may<sup>mos</sup> y tesoreros que han sido de las limosnas que hacen los dhos congregantes por no tener otras rentas ning<sup>a</sup>..." Visita de 1661 (ARANF, L-1, fol. 19r-19v).
21. Tras una justificación sumaria de la situación económica de la Co-fradía, por los mayordomos que fueron en 1660 y 1661, entregada el 19/05/1662 y el 10/01/1663 (ARANF, L-1, fol. 20r-21v), quedan unos folios en blanco (ARANF, L-1, fol. 22-24), retomándose las apuntaciones en un "Asiento y Memoria de los Maravedis que paran en poder de los Señores Diputados y tesoreros que son y en adelante fueren, los quales resultan de los alcances echos a los Sr<sup>es</sup> Congregantes Mayordomos que an ssido de dicha congreg<sup>n</sup>..." (ARANF, L-1, fol. 25r-25v), firmados por Juan de Villareal Balboa, en Madrid, a 8 de enero de 1675. Sigue un fragmento de justificación de gastos correspondientes a 1670, en cuyo margen queda anotado: "A fin del folio cuarenta empieza la razon de esta plana" (ARANF, L-1, fol. 26r) y, en efecto, allí comienza la data correspondiente al 1670. Se trata, a todas luces, de una compilación de documentación probablemente realizada en los inicios del XVIII.
22. Entre los gastos correspondientes a 1674 se anota, tras el coste de unas misas: "todos Boticarios en esta corte de que exhibieron Cartas de pago según y como tiene obligación a las mandar decir dicha congreg<sup>n</sup>. por cada uno Señor congregante o su mujer que muere" (Justificación de gastos [08/01/1675]. ARANF, L-1, fol. 32v-33v).
23. Justificación de gastos [28/11/1656] (ARANF, L-1, fol. 10r-11v). Al firmar el balance correspondiente a 1659, Agustín del Mercado lo hace como "Secretario del Colegio del glorioso San Lucas nuestro Patron y abogado" (Justificación de gastos [14/03/1660] (ARANF, L-1, fol. 15v-17r); José Pérez Espuche hace constar, en la reunión mantenida el 25/01/1672, su condición de "Diputado mayor de la Congregacion de los Señores Boticarios de esta Corte" (ARANF, L-1, fol. 29r-30r).
24. Y también de los beneficios económicos; en una nota justificativa de gastos, realizada tras la reunión celebrada el 29/01/1664, figura un alcance de 163 rs, favorables a la Hermandad, a cuenta del "Privilegio y las dos executorias de los pleitos y de alcavala y dos por ciento y el jubileo y se constituyo por depositario [Francisco Canseco, diputado mayor y tesorero]" (ARANF, L-1, fol. 36v).
25. Tales las cédulas de Juan de Villareal, Diego Carrasco, Antonio Ruiz, Manuel Bautista, Bernardo de Moles o Francisco Marín, por lo que debían del 'privilegio', y que quedan anotadas en "Lo que tiene en su poder Recibido el Sr. Jacinto Sanchez tesorero de la Congregación... [28/11/1656]" (ARANF, L-1, fol. 11v-12r).
26. Cf. Ramírez J. (comp.) Libro de las Bulas y Pragmáticas de los Reyes Católicos. Alcalá: por Lázaro Polono, 1503 (p. 156r-158r; 159v-160v) [edición facsimilar preparada por Alfonso García-Gallo y Miguel Ángel Pérez de la Canal. Madrid: Instituto de España, 1973].
27. "Tratose de la peticion que en el Consejo tienen dada los voticarios agravandose de querer cobrar de las medicinas compuestas el uno por ciento para la paga del servicio de los doce millones y de hacerseles registro dellas, cuia peticion se vio en quatro deste mes, que es para lo que oy esta llamado, y se voto y acordo el Reyno por mayor parte que no se haga registro, y que se consulte a Su Magestad sobre que no paguen uno por ciento las compuestas, y se signifiquen las razones que a ello mueben..." Cortes de Madrid 1626 (cf. Muñoz Garrido R., Muñiz Fernández C. Fuentes legales de la medicina española (siglos XIII-XIX). Salamanca: Universidad de Salamanca, 1969 (p. 198).
28. Cortes de Madrid 1626 (cf. Muñoz Garrido, Muñiz Fernández. Op.cit. nota 27, p. 198-199).
29. Cortes de Madrid 1626 (cf. Muñoz Garrido, Muñiz Fernández. Op. cit. nota 27, p. 198-199).
30. "... sobraron [373 rs] del primer Repartimiento que se hizo para seguir el pleyto que pusso a la congregación el Sr. Fiscal don Antonio de Zuloaga del Consejo de acienda, sobre el que se avia de pagar alcadaba y 2 por ciento de las medicinas". Cuentas tomadas a Jacinto Sánchez, tesorero [28/11/1656] (ARANF, L-1, fol. 11v-12r). Y "... [665 rs] del repartimiento que se hizo para la defensa de los pleitos que pusieron los asesores de rentas sobre el que aya de pagar el colegio alcabala y dos por ciento como pareció por una cedula firmada del señor tesorero..." "[867 rs] gastado en el litigio de los pleitos que tienen puestos los asesores de rentas de los oficios



de rentas y millones como pareció por una memoria firmada de su nombre” Cuentas tomadas a Jacinto Sánchez, tesorero [12/11/1657] (ARANF, L-1, fol. 14r-14v); “ [2.774 rs] que se an gastado en los dos pleitos de alcabala y tres [sic] por ciento desde veinte y cinco de octubre de seiscientos y cinqn<sup>ta</sup> y siete que fue quando se le dio el poder asta diez y siete de Junio de seiscientos cinq<sup>ta</sup> y nueve como pareció por una memoria . . .” Cuentas tomadas a Agustín Esteban, tesorero [14/03/1660] ARANF, L-1, fol. 17r-19r); “[275 rs] gastos que se an echo en los pleitos de alcabala y dos por ciento asta catorce de março de mill y seiscientos y setenta años” Cuentas tomadas a Agustín Esteban, tesorero [14/03/1660] ARANF, L-1, fol. 17r-19r).

31. El documento (ARANF, 1,5,2), firmado por los boticarios asistentes, nos permite conocer no solo sus nombres, sino la ubicación de sus establecimientos (cf. anexo).
32. “Paulino Benito en nombre de los Boticarios desta corte. Digo que [ . . . ] en las cortes del año de mil sei<sup>ta</sup>. y veinte y tres asta el de mil seiscientos veinte y nueve por resoluciones a diferentes consultas del Reino se sirvió demandar reelevar a mis p<sup>des</sup>. de la contribución del uno por ciento de las medecinas que bendan con condición que hiciesen registro dellas y de las boticas siempre que el arrendador [ . . . ] gravase en ellas. . .” El documento acompaña copia de las certificaciones correspondientes a las resoluciones de 08/08/1623 y 14/12/1629, formuladas en este sentido. Este escrito figura firmado por Gaspar de Arredonio en Madrid, a 27/07/1656 (ARANF, leg. 1,4,1).
33. El pleito se establece entre, por una parte, Juan Ramírez Fraile y Avellano, corregidor, Lorenzo López del Castillo y Cristóbal de Medina, regidores de Madrid y comisarios para la administración y cobranza del servicio del 1% y, por otra parte, Diego de Cortavila, Diego de Villaicán, Diego Fernández de Riofrío, Pedro Gutiérrez de Arévalo y Domingo de Escalante, boticarios y vecinos de Madrid “por si y en nombre de los demás boticarios”. El documento incluye copia de la sentencia dictada por el corregidor de Madrid el 25/08/1640 donde “se les dio por libres y mandaron no se cobre dellos. . .” frente al pleito iniciado en 25/04/1640; también incorpora el privilegio otorgado por Felipe V en Madrid, con fecha de 13/03/1650 (ARANF, leg. 1,5,1). (cf. “Sobre el impuesto de alcabala del 1% a los boticarios”. Manuscrito, 1656-1658. 89 fol. ARANF, leg. 1,5).
34. ARANF, leg. 1,4,2.
35. “Conclusión del pleito iniciado en 1656. Ejecutoria fechada en 1663 de las sentencias de 1656-57-68 y 59.” Manuscrito, 1656-1663. 36 fol. (ARANF, leg. 1,6). La ejecutoria se extiende a pedimento de “Jacinto Sánchez y de los demás Boticarios de la Corte”.
36. “Sabed: que pleito a pendido y se a tratado ante el Presidente y Oidores de el Nuestro Consejo y Contaduria Mayor de Hacienda, Jacinto Sánchez, por sí y los demás Boticarios de esta Corte y Paulino Benito su Procurador, en su nombre, de la una parte, y Domingo

Sanz de Bitteri y Thomas Sánchez, Diputados de Rentas de esta Villa, y el señor Don Diego Gonzalez de Bonilla, nuestro Fiscal, por el derecho de Nuestra Real Hacienda, de la otra; sobre que el dicho Jacinto Sanchez y Consortes pretendieron, que se les había de dar por libres de los repartimientos que se les avia hecho los años pasados [ . . . ] por razón de la alcavala, de los ingredientes que gastan y venden en sus Boticas, de los géneros que llaman simples. . .” (ARANF, leg. 1,6).

37. ARANF, leg. 1,6.
38. La sentencia queda firmada por Joseph de Ledesma, abogado de los Reales Consejos (ARANF, leg. 1,6).
39. El escrito está validado con las firmas de Marín Íñiguez Arnedo, licenciado Diego Loçisa, licenciado Juan de Valdés, Juan Francisco Ramos, Bernardo de Quirós y Luis Francisco de Castañeda, Escribano de Cámara; la ejecutoria fue registrada por Luis Francisco de Castañeda (ARANF, leg. 1,4,2).
40. “Dos instrumentos testimoniados sobre la repartición de seis soldados á los Boticarios de Madrid, resistencia q<sup>e</sup> hizieron sobre q<sup>e</sup> este repartimiento no se hiziese p<sup>r</sup> el Corregidor de Madrid en virtud de sus Privilegios, lo qual consiguieron como consta de los Autos del Consejo, q<sup>e</sup> aquí se expresan” Manuscrito, [1635], 7 fol. (ARANF, leg. 1,1,1).
41. Este gasto no llegó a repercutir sobre las arcas del gremio; a petición de estos tres boticarios, Manuel Robles emite testimonio, en 1 de septiembre de 1635, de que “los Voticarios desta Corte” entregaron a Gaspar de Valdés, Regidor de la Villa y Capitán de Infantería, “tres soldados con que los dichos voticarios ofręieron servir a Su Majestad para los dichos pressidios, pagados, vestidos y socorridos”; ese día otorgaron a Lucas Pacena 135 rs de plata y 90 de cuartos (ARANF, leg. 1,1,3).
42. “Los Boticarios desta Corte postrados a los Reales pies de V.M. con toda humildad representa[n], q. el Corregidor juzga[n]do q. su Arte es oficio mecanico, ha organizado con grandes aprietos que entre si repartan soldados [ . . . ] No trata[n] de eximirse de acudir co[n] todas sus fueręas en necesidad tan comun del servicio de Dios, y de V. Majestad, como lo han hecho en todas las ocasiones que se han ofrecido [ . . . ] Solo reparan en la forma q. es ofensiva, y de perjudicial consecuencia para adela[n]te, queriendo mancomunarlos con los demas gremios, y que el Corregidor sea dueño desta accion, compitiendo al Protomedicato, como parte formal de su ciencia, y a quien en todo esta[n] sujetos, y por do[n]de se han hecho los demas donativos. Suplican a V. majestad les honre como lo han hecho los señores Reyes sus progenitores; y mande que el Corregidor alce la mano desto; q. se borre en los libros este repartimie[n]to; que corra por mano del Protomedicato: q. ellos se obligan a dar los tres soldados con mucha puntualidad, y en la forma ordinaria, que en el lo reciban merced. . .” (ARANF, leg. 1,1,1).
43. El Rey remitió el memorial al Arzobispo de Granada, a la sazón presidente de su Consejo, en 22/06/1635; este, mediante decreto de



- 23/06/1635, les envía a Pedro Marmolejo, “que está nombrado para ajustar este mismo servicio con los Plateros, que tienen la propia pretensión de no ser comprendidos en los gremios” (ARANF, leg. 1,1,1). Con fecha de 28/06/1635, Pedro Marmolejo mandó llamar al escribano municipal “venga a hazer relacion de[n]tro de oy en todo el dia [...] Y traiga ansimismo la copia original que se dió para cobrar de ellos el dicho repartimiento” (ARANF, leg. 1,1,1).
44. “Los quales han reclamado, en consideracio[n] de que aviendo el Corregidor nombrado dos Boticarios por comisarios para la dicha concesion, y repartimiento, no lo acetaron, y otros han estado presos, y se han dexado sacar prendas por no contribuir por orde[n] del Corregidor: respeto de que su facultad no tiene comunidad con los demas gremios: y todos convienen en que es Arte cientifica de las mas preeminentes, y privilegiad<sup>s</sup>, y como tal favorecida por las leyes Reales. Esto ha[n] ocasionado la quexa que avemos representado a su Majestad [...] por estar como avemos estado sie[m]pre sujetos al Real Protomedicato, y todos a su bureo. No nos escusamos de servir a su Majestad con nuestras vidas, y haciendas, en tiempo que los Grandes y Titulos lo haze[n]. Solo reparamos en la forma, modo, y judicatura que se ha tomado, porque en lo futuro no aya perjudiciales consecuencias...” (ARANF, leg. 1,1,1).
  45. El Consejo Real citó para declarar, en 28/06/1635, a Manuel de Robles, escribano de número de la Villa, este remitió al alguacil Alonso Aguado. Ese mismo día, Pedro Marmolejo solicitó de Alonso Aguado la documentación que afectaba al pleito. Alonso Aguado “compulso, y apremiado, por redimir su bexacion entregó la dicha copia original con un mandamiento al pie della del dicho Corregidor” (ARANF, leg. 1,1,1).
  46. El Auto queda firmado por Fernando de Llano y Valdés, arzobispo de Granada, Fernando Rodríguez Fariñas, Gregorio López Madera y Pedro Marmolejo, en Madrid, a 21/08/1635 (ARANF, leg. 1,1,1).
  47. “... y que dichos Gregorio Gonçalez, y consortes [Diego de Cortadilla y Martín de la Vega] en perjuicio de los demas de su profesio[n] no pudiero[n], ni devieron conceder los dichos tres soldados, ni hazer el dicho repartimie[n]to por la villa...” (ARANF, leg. 1,1,1).
  48. “... y q sin embargo todo lo susodicho se devia ejecutar el dicho repartimie[n]to; y q se notifique a Diego de Villayzan, Pedro Gutierrez de Arevalo, Diego Ferna[n]dez de Riofrío, y Gabriel de Bonilla Boticarios, q tiene[n] poder de los demas desta Corte, hagan repartimie[n]to nuevame[n]te dentro de segu[n]do dia, co[n]forme a la hazie[n]da q cada uno tuviere, y a lo que está tratado con el dicho señor don Pedro Marmolejo, q. son cinco soldados, dos mas de los q repartier[on] los dichos Gregorio Gonçalez, y co[n]sortes: que después de largas conferencias, y ofrecimientos, se han concordado en el dicho numero [...] y que se les ha de guardar a los dichos Boticarios sus privilegios, y prehemine[n]cias, que por razon de su ejercicio está dispuesto por leyes destos Reynos...” (ARANF, leg. 1,1,1).
  49. En su nueva petición, presentada ante Pedro Marmolejo por Diego de Villaizan, Pedro Gutiérrez de Arévalo, Diego Fernández Riofrío y Domingo de Escalante, informan de haber recibido noticia de que el conde de Montalvo, Corregidor de la Villa de Madrid, ha pedido tres soldados a Gregorio González, Diego de Cortadilla y Martín de la Vega, y que hagan repartimiento entre los demás de la Corte “y, por que no lo an echo, los a mandado poner en la carcel” (ARANF, leg. 1,1,3).
  50. Bartolomé Fernández, en nombre de sus representados, presentó petición para que se les mandase eximir del repartimiento hecho de cinco soldados y que contra ellos no se ejecutase sentencia hasta que Pedro Marmolejo dictaminase (ARANF, leg. 1,1,3).
  51. “Felipe de Cuellar Saavedra, en nombre de los Boticarios desta Corte, digo: que el Corregidor desta Villa, juzgando que mis Partes eran comprendidas entre los oficios mecanicos, los repartio tres soldados; agraviaronse mis partes deste repartimiento y de que se les quisiese poner entre los Gremios [...] viendo que mis Partes tenian fundamento solido en derecho para lo dicho, y que voluntariamente ofrecían servir con cinco soldados para las dos guerras presentes, y que solo trataban de que se les conservasen sus privilegios, vino en ello [...] Y para que en todo tiempo esto tenga firmeza y no sean mis Partes ynquietados ni molestados [...] Pido y suplico a V.A. mande se les de a mis Partes Vuestra Real Provision sobre Carta, para que el Corregidor desta Villa, y demas Justicia, guarden dichos Autos...” El escrito lleva las firmas de Felipe de Cuéllar Saavedra y del licenciado Gonzalo de Rivero (ARANF, leg. 1,1,3).
  52. “Guardese el Auto del Señor Don Pedro Marmolejo, y deseles a esta Parte testimonio inse[r]to en el dicho Auto como se a echo con otros Gremios desta Corte”. Madrid, 23/10/1636. Licenciado Palacios (ARANF, leg. 1,1,3).
  53. Cf. el Auto de Pedro Marmolejo, de fecha 12/10/1635: “mandó que Pedro Gutierrez de Arevalo, Diego de Villayzan, Diego Fernandez de Riofrío y Gabriel de Vonilla que hizieron el segundo repartimiento, la mayor parte dellos se juntasen, con Juan Caçadoz, Voticario de Su Majestad y viesen lo susso dicho y ynformasen a dicho señor” (ARANF, leg. 1,1,3). Reunidos, elaboraron un informe -que no ha llegado hasta nosotros- y este fue presentado a los Señores del Consejo en 14/10/1636 (ARANF, leg. 1,1,3).
  54. “Y porque no es su intención escussarse de servir a Su Majestad con sus haciendas y vidas [...] solo reparan en la forma de darlos, que és, mancomunarlos con los demas Gremios y oficios ordinarios de la republica, contraviniedo a los Autos proveydos por Vuestra Merced y aprovados por el Consejo [...] ofrecen de nuevo servir a Su Majestad con otro soldado, demas de los zinco que tienen convenido y contratado con Vuestra Merced, que por todos son seis soldados...”: tres que Diego de Cortabila, Gregorio González y Martín de la Vega entregaron al Conde de Revilla en junio de 1635, los dos que Diego de Villaycán, Pedro Gutiérrez de Arevalo, Diego Fernández de Riofrío y



Gabriel de Bonilla pactaron en la misma ocasión “y uno que agora forren de nuevo, con los cuales son seis, que es el numero que se les a pedido en dicha dos ocasiones. . .” (ARANF, leg. 1,1,3). Ante esta petición, Pedro Marmolejo emite un Auto, fechado el 31/10/1636, en el que recuerda los proveídos en 21/08/1635 y 23/10/1636, y establece, ante Juan Gómez Hidalgo, “que cualquier escribano, dando primero un recado, haga notorio dichos Autos, y lo en ello y cualquiera dellos contenido, al Señor Conde de Montalvo, del Consejo de Su Majestad en los de Guerra y Hazienda y Corregidor desta Villa, para que los guarde y cumpla como los Señores del Consejo lo Manden. . .” El auto se notifica al conde de Montalvo, quien lo trasladó a Manuel Robles, “para que se viesse y proveyesse lo que al servicio de Su Majestad combiniessse. . .”, de todo ello se pasó copia a Pedro Martínez, secretario mayor del Ayuntamiento; el escrito, incorporado al expediente promovido en 1635, queda firmado en Madrid, a 24/10/1636, por Juan Gómez Hidalgo (ARANF, leg. 1,1,3).

55. “En 30 de Agosto de 1658, / En la Villa de Madrid llamo a los Boticarios desta c<sup>e</sup> Jacinto Sanchez familiar y not<sup>o</sup> del Santo Oficio y a Esteban de Moya para que repartiesemos entre nosotros todos los dhos voticarios un donatibo para su maj<sup>o</sup> para la ocasión preste de las guerras de Portugal y sitio de Badajoz abiendo ido y estado con su SS<sup>a</sup> el Marq<sup>s</sup> de Casares Correg<sup>or</sup> desta Villa, D<sup>n</sup>. Fran<sup>co</sup> Ignacio de Trasmiera, don Rodrigo Dergas, don Diego de la Torre y don Cosme Abaunza, regidores desta comisaria p<sup>a</sup> este servicio y representandoles un prebillejo que tienen los dhos boticarios de su Mag<sup>d</sup>. en que la villa de M<sup>d</sup> no les puede pedir soldado y enprestamos ni donativos si no es el Real Protomedicato quando les pida y así mandaron obedezerlo, y se quedo en este estado” (ARANF, leg. 1,3).
56. A ello alude la resolución tomada con fecha de 29 de mayo de 1626, de la que luego habremos de ocuparnos: “Los boticarios dieron asimismo Petición agravándose de averse hecho arecordamiento para que se cobrase dellos el uno por ciento de las medicinas que bendiesen y con condición que hiciesen resibo dellas y de las boticas siempre que el arrendador quisiese. Y pidieron se declarase no deberse cobrar de las medicinas este derecho por ser Hesenta y Libres de todo despacho y tributo [...] Precio que se da por ellas [las medicinas] no es por el valor de la materia sino por la Pericia del que la dis Pone de que ni se debe alcavala ni otro ningún derecho” (ARANF, leg. 1,4,2).
57. [Petición al Rey de España, firmada por Miguel de Monsalve, solicitando la exención de la tasa del 1% en la venta de medicamentos]. [Madrid, ca. 1650]. British Library, [Humanities and Social Sciences, St Pancras Reading Rooms] General Reference Collection, signatura 765.i.8.(50.)
58. AHN, Consejos, L-1510, fol. 440-443.
59. La Real Cédula insiste en la subordinación de los boticarios al Real Tribunal del Protomedicato: “. . . y que asimismo como a los profesores

del en mi corte ayan de estar y andar y esten unidos agregados e yncorporados como yo los agrego, uno e yncorpo al tribunal de el mi Protomedicato para que este exercicio y arte no pueda ser junto ni llamado con ninguno de los oficios mecanicos en ningun Repartimiento que se haga por via de gremio ni en otra forma ni manera alguna [. . .] sin estar ni quedar en quanto a esto en otro ningun tiempo dependientes de otro ningun tribunal mas que tan solam<sup>te</sup> de el dho protomedicato, en quanto a los dhos Repartimientos y no en otra cosa alguna en cuya merced haveis de ser mantenidos y amparados sin que della podais ser despojados. . .” (ARANF, leg. 1,2).

60. “. . . y si de la gracia y m<sup>rd</sup> que por esta mi carta os hago quisieredes privilegio y confirmacion della mando a los mis Conzertadores y escribanos mayores de los privilegios y confirmaciones y al mi mayordomo canciller y notarios mayores y a los otros ofiziales que estan a la tabla de mis sellos que os la den libren pasen y sellen la mas fuerte firme y vastante que les pidieredes y menester ubieredes. Y declaro que desta me<sup>rd</sup> haveis pagado el dr<sup>o</sup> de la media anata que ymporto siete mill y quinientos m<sup>rs</sup> el qual haveis de pagar conforme a reglas hasta la misma cant<sup>d</sup> de quince en quince años perpetuamente de que ha de constar por certificación de la Cont<sup>dria</sup> deste derecho, llegado el caso de cumplirse los quince años y no lo pagando no podais usar desta me<sup>rd</sup>. sin que primero conste haverla satisfecho” (ARANF, leg. 1,2). El documento lleva la firma autógrafa de Felipe IV, la de su Secretario, Antonio Carnero, la de su Canciller Mayor, Pedro de Castañeda, y las de José de Guadiaro y Gamboa, Antonio del Campo Redondo Río y Antonio de Contreras. El documento incluye un resumen de su contenido: “V. Mag<sup>a</sup> hace m<sup>rd</sup> a los Voticarios desta corte y Villa de declarar que el exercicio de sus oficios es arte eximiendolos de la Jurisdiccion del Correg<sup>or</sup> de Madrid quedando agregados al tribunal del protomedicato para en quanto a los Repart<sup>mtos</sup> que se hicieren y no en mas” (ARANF, leg. 1,2).
61. “En la Villa de Madrid A Veinte dias del mes de Agosto del año de mil y seis<sup>o</sup> y Cinquenta por parte del arte de los Voticarios desta Villa Ante los Sr<sup>es</sup> Vizconde de Laguna Corre<sup>or</sup> della y D. Rodrigo Gomez de Rozas regidor desta Villa y Comiss<sup>o</sup> del servicio de soldados de milicia se pres<sup>to</sup> el privilegio de Su M<sup>gd</sup> y por los dh<sup>os</sup> Sr<sup>es</sup> visto le ovedecieron y mandaron se guarde y cumpla y egecute como en el se qn<sup>e</sup> del qual quede un t<sup>do</sup> en poder del prest<sup>o</sup>. S<sup>no</sup>. Y firman Vizconde de Laguna / R [Rodrigo] Gómez de Rozas / Juan Manrique”. “Privilegio a los boticarios de Madrid por el que quedaban exentos del reparto de la alcabala del 1%, por ser la farmacia arte científico”. Manuscrito, 7 fol. (ARANF, leg. 1,2).
62. “Dos Certificaciones dadas a pedimento de los Boticarios; sobre que se les relevasse de pagar el uno por Ciento que les querían hacer contribuir, dadas por Gaspar de Arredonio y Marcos Ant<sup>o</sup>. de Molina en los años de 1657 y 1657”. Manuscrito, (ARANF, leg. 1,4). En este instrumento Paulino Benito, quien actúa en representación de “los Boticarios de esta corte”, alude a diferentes resoluciones emi-





- tidas a favor del gremio de los boticarios entre 1623 y 1629 (ARANF, leg. 1,4,1). Tanto Gaspar de Arredonio como Marcos Antonio Molina concretan, en sus respectivos escritos, que esta resolución fue tomada por las Cortes reunidas en Madrid el 29/05/1626, a la que hemos hecho referencia líneas arriba (cf. "Sobre impuestos y cargas fiscales a boticarios". Manuscrito, 1656-1657. 24 fol. ARANF, leg. 1,4).
63. "Los Jurados de la Ciudad de Toledo pusieron demanda á D<sup>n</sup> Pedro Cid de Oliva Boticario en d<sup>ha</sup> Ciudad sobre no admitirle p<sup>r</sup> Jurado p<sup>r</sup> aver sido Boticario, y en contradictorio Juicio se sentencio p<sup>r</sup> el Consejo á favor del d<sup>ho</sup> D<sup>n</sup> Pedro Cid de Oliva como consta p<sup>r</sup> este Instrumento. . . ". "Actos destacados en los que han intervenido algunos boticarios". Manuscrito, 1655-1667. 30 fol (ARANF, leg. 1,3).
  64. Para lo cual se fija un horario de permanencia en sus boticas: de 10 a 14 horas y de 15 a 22 horas.
  65. Cortes de Valladolid, 154 (Muñoz Garrido, Muñoz Fernández. Op. cit. nota 27, p. 27-28).
  66. "En 19 de Octubre de 1689, proveyó Auto el Consejo á instancia de los Boticarios de Salamanca en Juicio contradictorio con los S<sup>es</sup>meros, i Procurados del Común de ella, mandando dar Real Provisión, en conformidad de la respuesta Fiscal del 18 de Septiembre del mismo año, para que á los dichos Boticarios no se compela, ni apremie, á que acepten ni sirvan el oficio de Mayordomo del Común, ni otro ninguno que requiera alguna asistencia personal, aunque sea honorífico, ni puedan aceptar voluntariamente; i que las Justicias les prohiban cualquier trato, i comercio, u otras qualesquier ocupaciones, que les puedan divertir de la asistencia continua de sus Boticas, i que lo mismo se observe, i guarde con los demas Boticarios de todo el Reino; i para ello se den los despachos necesarios. . . " (Tomo segundo de autos-acordados, que contiene los Libros tercero, y quarto por el orden de títulos de las Leyes de Recopilación. Madrid: Por D. Joachin Ibarra, 1777, cf. p. 396-397).
  67. Diego Rejón de la Lama, secretario mayor del Ayuntamiento de Madrid, en ausencia por enfermedad de Martín Verdugo, certifica que el 29/09/1667, "estando juntos en el Ayuntamiento los Corregidores, como es costumbre, para las elecciones de oficios, Alcaldes de la Santa Hermandad y de la Mesta", se trató de nombrar fiel por la parroquia de san Salvador, "quien hubiere de obtener y ser admitido, al dho cargo a de ser xstiano viexo limpio de toda mala raza, Cavallero escudero hijodalgo de sangre nattural vecino desta v<sup>a</sup> y con vista de la memoria de los parrochianos. . . " y entre los que se presentaron figura Jacinto Sánchez de Brizuela; metido en un cántaro de plata, junto al nombre de los otros electos, salió el suyo, "y quedó elegido por fiel, como figura en el libro de elecciones", de lo que Diego Rejón da copia, en papel sellado, firmado a 29/11/1669 (ARANF, leg. 1,3).
  68. Cuentas tomadas a Agustín Esteban, tesorero [14/03/1660]. ARANF, L-1, fol. 17r-19r).
  69. En 1654 las cuotas anuales están fijadas en 54 rs; en el momento de entrada en la Congregación se abonaban 44 rs; así permanecieron, al menos, hasta 1675.
  70. Tal los 100 rs entregados, en 1669, por Esteban Sánchez de Moya, en su condición de diputado mayor durante ese año (Justificación de gastos [06/02/1670]. ARANF, L-1, fol. 40v, 26r-26v).
  71. En el acta de la reunión celebrada el 22/11/1655, se acuerda, tras anotar la cantidad que ha quedado sin cobrar "y estos [gastos] los pasa la congregación en q<sup>ta</sup> por ahora mas de aquí en adelante an de ser por q<sup>ta</sup> de los mayordomos que hubiese" (ARANF, L-1, fol. 8r-9v).
  72. "... al Letrado quando se fue a preguntar si se podian cobrar los ordinarios por justicia y respondio que si" (Justificación de gastos [28/11/1656]. ARANF, L-1, fol. 10r-11v); a los alguaciles, para que cobrasen el ultimo repartimiento que se hizo en 18/08/1659, 200 rs (Cuentas tomadas a Agustín Esteban, tesorero [14/03/1660]. ARANF, L-1, fol. 17r-19r).
  73. Entonces quedan fijados, los gastos correspondientes a las fiestas de Nuestra Señora de la Purificación y del Señor San Lucas, incluido el monto correspondiente al Convento de San Felipe, en 1.400 rs (Justificación de gastos [22/11/1655]. ARANF, L-1, fol. 8r-9v); en la justificación de cuentas correspondiente a 1671 se especificará que 1.000 rs se destinan a la fiesta de San Lucas y 400 a la de Nuestra Señora (Justificación de gastos [25/01/1672] (ARANF, L-1, fol. 29r-30r), tales cantidades se mantendrán, al menos, hasta 1675.
  74. En la reunión celebrada, el 12/09/1668, "junta la mayor parte de los señores oficiales y señores mas antiguos de la congregacion [...] en cassa del Sr. Estevan Sanchez de Moya diputado mayor de dicha congregacion para tratar y conferir cosas tocantes [a] devitos que deven muchos señores congregantes que han sido mayordomos y oficiales y dan por escusa para no dar quantas el que muchos señores congregantes no les han pagado los ordinarios que les toca, y assi han convenido que dando las quantas, y comprobando los que legítimamente no ubieren pagado se cobre lo líquidamente parecieren dever y que esto no sirva de ejemplar para los de enadelante y que solo sirviese hacer esta equidad el aver algunos devitos muy antiguos que al parecer se imposibilitan cobrar y por ser assi lo firmaron en dicho dia mes y año. . . " (ARANF, L-1, fol. 40r).
  75. Un "Asiento y Memoria de los Maravedis que paran en poder de los Señores Diputados y tesoreros que son y en adelante fueren, los quales resultan de los alcances echos a los S<sup>tes</sup> Congregantes Mayordomos que an ssido de dicha congreg<sup>n</sup>. . . ", realizado por Juan Villarreal Balboa, fechado a 08/01/1675, da cuenta de los últimos movimientos económicos de la Corporación durante los años 1673-1675 (ARANF, L-1, fol. 25r-25v).
  76. Incluimos en este bloque la cera con la que se ilumina las ceremonias religiosas, la música con la que estas se acompañaban, los





abonos realizados a los religiosos que dijeron misa y predicaron en ella, la impresión de las papeletas del jubileo, el “Armar el altar bestido de velillo poner macetas y Ramilletes de Mano dosel y colgadura”, el traslado de la imagen de san Lucas, el cuidado del altar por los sacristanes, el alquiler de blandones y bayetas, el adorno de los braseros, las luminarias, clarines y ramilletes de campo para los adornos, el pago al Convento de San Felipe por permitir las celebraciones en su iglesia y el abono a los mozos por poner los bancos, barrer la iglesia y armar el túmulo el día de ánimas; ocasionalmente también se contrataron los servicios de un polvorista o se construyó un guion de la Corporación con sus aderezos.

77. Limosnas entregadas a ‘boticarios pobres’ bajo firma del diputado mayor.
78. Gastos de secretaría, relacionados con la actividad gremial de la Corporación: memorias presentadas ante el Real Tribunal del Protomedicato, copias de privilegios, consultas notariales, pleitos y litigios, etc.
79. Derivados de la devaluación de la moneda, como consecuencia de la Real Pragmática de 06/05/1659, por la que se redujo la moneda de vellón grueso a la mitad (cf. Aragón Ruano A, Alberdi Lonbide X. El premio de la plata y la devaluación del vellón en Guipúzcoa en el siglo XVII. Espacio, Tiempo y Forma, serie IV [Historia Moderna] 2001; 14: 315-347).
80. Buena parte de los gastos que, en otras ocasiones, corrieron por cuenta de los mayordomos, figuran, en las cuentas de gastos de 1658 y 1659, como abonados por el tesorero de la Congregación (cf. Cuentas tomadas a Agustín Esteban, tesorero [14/03/1660]. ARANF, L-1, fol. 17r-19r); al tratarse de una justificación sumaria de ambos años, hemos optado por dividir entre dos el montante total, cuando no ha sido posible adjudicarlo a un año concreto.
81. En 1659 se anota una devaluación del capital: “A Joseph Perez, mayordomo, por la baja que ubo en la moneda que estuvo en su poder que aunque abra en su poder trescientos y setenta y dos reales no les rebajarian ni pasan en cuenta mas de los ochenta y seis reales” (Justificación de gastos [14/03/1660]. ARANF, L-1, fol. 15v-17r).
82. La justificación de cuentas correspondientes a los años 1660 y 1661 se presenta tardíamente y de manera fragmentaria; Jerónimo de la Fuente Piérola y Bernardo de Moles, mayordomos en 1660, entregarán su justificación, conjuntamente con Diego Nicol, mayordomo en 1661, en una reunión tenida, en Madrid, a 19/05/1662 (ARANF, L-1, fol. 20r-21r); Juan Muñoz, segundo mayordomo de 1661, no las entregará hasta el 10/01/1663 (ARANF, L-1, fol. 21v).
83. En 1664 se anota una nueva baja en los fondos de la Corporación por devaluación de la moneda: “... que los cogio al Sr. Thess<sup>o</sup> y SS<sup>es</sup> Mayordomos la vaxa de la moneda con mil y sey<sup>os</sup> y nobenta y seys reales en que havia de perdida ochocientos y cuarenta y ocho y considerando los empeños en que se halla la congregación porque

no tenga tanta perdida se convinieron los d<sup>hos</sup> señor Thess<sup>o</sup> y Mayordomos en q<sup>e</sup> se perdiese por mitad a favor de la congregación con que de parte de la congregación se admitio por el respeto d<sup>ho</sup> & se les hacen buenos los quatro cientos y veinticuatro reales correspondientes a la mitad...” (Justificación de gastos [10/01/1665]. ARANF, L-1, fol. 37r-38r).

84. El primer inventario de bienes que ha llegado hasta nosotros se realiza el 25/01/1672: “Treinta achas con su correage y una arca en que se guardan las d<sup>has</sup> achas, [Item] mas El estandarte con sus borlas baxa Cruz y remates. [Item] mas El cajon q<sup>e</sup> esta en la capilla con su sobremesa. [Item] mas seys candeleros de Laton con su Cruz. [Item] mas seys candeleros de madera dados de color. [Item] mas seys macetas con sus flores. [Item] mas el santo. La campanilla, tintero y salbadera, [Item] mas La caja en que se pide la limosna” (Justificación de gastos [25/01/1672]. ARANF, L-1, fol. 29r-30r).
85. Juan de Moya, Boticario mayor de S.M., ocupó el cargo de diputado mayor en 1700 y 1701; como contador en esos años actuó Francisco Martín Llorente, Ayuda de Boticario Mayor de S.M.
86. El 03/01/1700 se hizo efectiva la primera limosna, 120 rs, aportada por Miguel de Iztueta; le siguieron, con diferentes cantidades, Juan de Moya, Antonio de Ano, Francisco Martínez, Lucas Casero, Francisco Díaz Santa Gema, Diego Bartolomé, Juan de Armunia, Francisco López del Castillo y Juan Ruiz de la Cámara, todas ellas fechadas el 09/02/1700. De estos ingresos se haría cargo el nuevo tesorero de la Corporación (Razón tomada por Francisco Martín Llorente “Cont<sup>dor</sup> del Colegio de los Boticarios desta Corte” con que contribuyeron los colegiales del Colegio desde el 1-I-1700. ARANF, L-1, fol. 49r-52r).

Si desea citar nuestro artículo:

**La Congregación y Colegio de Boticarios del Señor San Lucas y nuestra Señora de la Purificación de Madrid (1654-1675)**

Antonio I. González Bueno

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 88. n<sup>o</sup> extra (2022) · pp. 675-692

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.29>


**Anexo. Boticarios integrados en la Congregación y Colegio de El Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación (1654-1675)**

<b>Boticario</b>	<b>Ingreso</b>	<b>Última referencia</b>	<b>Ubicación de la botica [año]</b>
Aguado, Pedro	1654	1668	Santa Bárbara [1656]
Alonso Terán, Manuel	1654	1662	---
Ano, Antonio del	1668	1675 [*]	---
Arroyo, Pedro de	1664	1674 [+]	---
Balboa, Francisco Antonio	1664	1674 [*]	---
Basilio, Edmundo	1665	1667	---
Bonilla, Gabriel de	1654	1636	---
Bonilla, Juan de	1654	1662 [+]	Santísima Trinidad [1656]
Bravo, Alonso	1654	1662 [+]	San Sebastián [1656]
Brito, Manuel de	1654	1655	---
Buitrago, Pedro	1654	1656	---
Canseco, Francisco	1654	1674	---
Canseco, Juan de	1654	1662 [+]	---
Carrasco, Diego	1654	1656	---
Casa La Fuente, Juan de	1654	1659	---
Cortavila, Santiago	1654	1661	---
Criado, Juan	1654	1671	Plaza Mayor [1656]
Delgado, Juan	1654	1656 [+]	---
Díaz, Lope	1666	1669	---
Díaz de Miranda, Ventura	1663	1674	---
Díaz de Morales, Juan	1657	1669 [+]	---
Díez de Mercado, Agustín	1664	1672	León [1656]
Escalante, Domingo	1654	1654	---
Esteban, Agustín	1654	1673	---
Esteban, Juan	1656	1656	Santiago [1656]
Fonseca, Lucas de	1654	1657 [+]	---
Fuente, Marcos de la	1654	1655	---
Fuente Izcala, Jerónimo de la	1656	1672	Santa Cruz [1656]
Gabaux, Jean	1654	1654	---
García de la Fuente, Juan	1656	1656	---
García Valiente, Juan	1654	1659 [+]	---
Gonzalez, Juan	1654	1654	---
Gutiérrez de Arévalo, Pedro	1654	1654 [+]	---
Herrera, Francisco de	1654	1662 [+]	Plaza Santo Domingo [1656]
Isnardo de Mora, Antonio	1665	1674 [*]	---
Januario, Onofre	1654	1662 [+]	---
Jover, Domingo	1667	1674	---
Lopez de Moya, Lucas	1654	1674	Red de San Luis [1656]
Maiz, Miguel	1673	1673	---



Maiz, Miguel	1673	1673	---
Manso, Pedro	1672	1674	---
Marín, Francisco	1654	1663	Puerta del Sol [1656]
Martínez, Francisco	1664	1675 [*]	---
Martínez Guerrero, Diego	1654	1662 [+]	---
Martínez de Herrera, Pedro	1654	1674	---
Maseda, Pedro	1654	1667	Silva [Hospital] [1656]
Merlo, Jaime	1654	1657 [+]	---
Miguel, Francisco	1659	1674 [+]	---
Míos, Claudio	1673	1673	---
Moles, Bernardo de	1654	1671	---
Muñoz, Juan	1654	1675	---
Nicol, Diego	1654	1661	---
Ocampo, Manuel Bautista de	1654	1671 [+]	---
Ocio, Jacinto del	1675	1675	---
Ortiz, Francisco	1654	1674	---
Osset, Baltasar	1665	1668	---
Pascual, Bartolomé	1656	1657	Puerta Cerrada [1656]
Peña, Luis de la	1654	1662 [+]	---
Pérez de Bergara, Diego Felipe	1669	1669 [+]	---
Pérez de Bergara, Rodrigo	1654	1656	---
Pérez Espuche, José	1654	1672	---
Pérez de Rodrigo, Jerónimo	1654	1661 [+]	Carmen [1656]
Porras, Julián de	1654	1656 [+]	---
Preso, José	1654	1654	---
Rodríguez, Antonio	1654	1655	---
Rodríguez, Jerónimo	1656	1656	---
Rodríguez, José	1659	1665	---
Rojo, Santiago	1654	1656	---
Ruiz Díaz, Juan	1655	1664	---
Ruiz de Escobar, Antonio	1654	1671 [+]	Antón Martín [1656]
Sánchez de Brizuela, Jacinto	1654	1674	Platerías [1656]
Sánchez de Mena, Antonio	1654	1667	Ancha de San Bernardo [1656]
Sánchez de Mena, Juan	1654	1675 [*]	Plazuela de Santo Domingo [1656]
Sánchez de Moya, Esteban	1654	1669	Puerta Cerrada [1656]
Serrano Redondo, Pedro	1654	1674	León [1656]
Sierto, Baltasar de	1654	1656	Red de San Luis [1656]
Tello de Soria, Juan de	1672	1673	---
Villaizan, Francisco de	1654	1664 [+]	Ángeles [1656]
Villareal Balboa, Juan de	1654	1674	Mayor [junto a San Felipe] [1656]
Viso, Juan del	1654	1654	---
Zicur, Martín de	1664	1671 [+]	---

## LAS BOTICAS DEL MAR. INVENTARIOS DE BOTICAS EMBARCADAS EN LA CARRERA DE INDIAS

### THE PHARMACIES OF THE SEA. INVENTORIES OF BOTICAS EMBARKED ON THE RACE TO INDIAS

Cecilio J. Venegas Fito<sup>1,3</sup>, Raquel C. Cueli Trelle<sup>2</sup> y Antonio Ramos Carrillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio Oficial de Farmacéuticos de Badajoz, C. Ramón Albarrán, 15, bajo 06002

<sup>2</sup>Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C. Profesor García González, 2

<sup>3</sup>Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

corresponding author: ceciliojosevenegas@redfarma.org

#### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

#### RESUMEN

Con el inicio del Renacimiento aconteció un despertar en la sociedad europea experimentando cambios de crecimiento personal y forma de vida junto con inquietudes científicas que se traducen en la búsqueda de nuevos territorios, como en este caso: la Colonización de América. Esta supuso una revolución botánica con la introducción de nuevas plantas, drogas y fármacos a la terapéutica de las enfermedades de España del siglo XVI, que seguía hasta ese momento una farmacoterapia fundamentada en el galenismo, completada con los remedios de Paracelso y del mundo oriental, lo cual es constatable en los inventarios analizados. Estos inventarios incluyen además de los simples y compuestos utilizados, lo que ahora denominaríamos material sanitario como clísteres y orinales, siendo de ayuda para vislumbrar las aplicaciones de las terapias y de los fármacos. Por otro lado, podemos observar la presencia de las drogas de procedencia americana como el ruibarbo de Indias, la cañañistula y el drago.

Las diferentes expediciones se encuentran en un marco histórico con un mismo denominador en común, la búsqueda de especias y oro, el comercio, aunque asimismo incluimos la instalación de una farmacia oficial en Puerto Rico.

Los inventarios analizados de los remedios embarcados en las flotas en estas travesías son: el inventario de la expedición de Juan de Aguado de 1495, la expedición de Pedrarias Dávila en 1513, el inventario de Fray Luis de Figueroa en 1516, el inventario de Hernando de Torres en 1512 y, por último, el inventario de los remedios embarcados en la expedición de Magallanes – Elcano. Todos de gran interés, la importancia de la primera vuelta al mundo pone en valor ese inventario. Por su parte, la institucionalización de las farmacias en América comenzó con el boticario sevillano Hernando de Torres y su llegada a Puerto Rico en 1512, este inventario incluía instrumentos clásicos del arte farmacéutico como morteros y balanzas, especias y medicamentos variados en formas farmacéuticas como ungüentos y jarabes.

#### ABSTRACT

*With the beginning of the Renaissance, an awakening occurred in European society experiencing changes in personal growth and way of life along with scientific concerns that translate into the search for new territories, as in this case: the Colonization of America. This was a botanical revolution with the introduction of new plants, drugs and drugs to the therapeutics of the diseases of Spain of the sixteenth century, which followed until then a pharmacotherapy based on Galenism, completed with the remedies of Paracelsus and the oriental world, which is verifiable in the inventories analyzed. These inventories include, in addition to the simple and compounds used, what we would now call medical equipment such as clisters and urinals, being helpful to glimpse the applications of therapies and drugs. On the other hand, we can observe the presence of drugs of American origin such as Indian rhubarb, cane and dragon tree.*

*The different expeditions are in a historical framework with the same common denominator, the search for spices and gold, trade, although we also include the installation of an official pharmacy in Puerto Rico.*

*The inventories analyzed of the remedies embarked on the fleets on these voyages are: the inventory of the expedition of Juan de Aguado of 1495, the expedition of Pedrarias Dávila in 1513, the inventory of Fray Luis de Figueroa in 1516, the inventory of Hernando de Torres in 1512 and, finally, the inventory of the remedies embarked on the expedition of Magellan – Elcano. All of great interest, the importance of the first round the world puts in value that inventory. For its part, the institutionalization of pharmacies in America began with the Sevillian apothecary Hernando de Torres and his arrival in Puerto Rico in 1512, this inventory included classic instruments of pharmaceutical art such as mortars and scales, spices and varied medicines in pharmaceutical forms such as ointments and syrups.*

#### Palabras Clave:

América  
inventario  
boticas  
Indias

#### Keywords:

America  
inventory  
apothecaries  
Indies



## 1. INTRODUCCIÓN

Se nos ofrece hoy en día, a través del feliz nonagésimo aniversario de la revista *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, la posibilidad de colaborar en el número extraordinario conmemorativo.

Nuestra participación tiene que ver con nuestra actual línea de investigación en relación con la botica y los boticarios, la Historia de la Farmacia y de la Terapéutica, en el primer tiempo histórico de las exploraciones y descubrimientos realizados por los españoles en América. Desde la disciplina de la Historia de la Farmacia de la Facultad de Farmacia de Sevilla debemos tener una especial vinculación con la cuestión aunque, naturalmente, éste es un tema que había sido ya transitado. En particular José Luis Valverde con sus catálogos de documentos de interés histórico - farmacéutico conservados en el Archivo General de Simancas, Navarra y Sevilla, este último con la colaboración de Josefina Hidalgo, y otros con Carmen Marín, Mercedes Fernández Carrión y otros. Ahora, los medios de búsqueda automatizada y la digitalización de bibliotecas y archivos ponen a nuestro alcance mayores posibilidades de búsqueda documental y trabajos previos sobre esta materia.

Particularmente, también con ocasión del Quinientos Aniversario del primer viaje de circunnavegación llevado a cabo por la Armada de Magallanes y Elcano, hemos publicado el único libro registrado sobre esta materia aún en la avalancha de obras que han salido de diversas editoriales a este respecto (1). La Expedición de Magallanes y Elcano ha sido punto de atención difusiva para muy diversos soportes y medios de comunicación, y nos pareció una buena ocasión de estar presentes con aportes sobre la Historia de la Farmacia en estos años. Además, el inventario en las embarcaciones resulta una pieza importante en relación con el conocimiento sobre la terapia de la época examinada.

En este mismo orden de acontecimientos, nos hemos hecho eco, conjuntamente con el estudio del botiquín de a bordo, de aquellos que partieron a las Indias (2) para ejercer el entonces oficio de boticario en las tierras recién descubiertas. Una de las boticas que analizaremos estaba destinada a su vez a la fundación de un hospital en Santa María la Antigua del Darién, hecho que finalmente no tuvo lugar, y otra incumbe al registro del inventario del primer boticario establecido con los oportunos requerimientos legales en el Nuevo Mundo en Puerto Rico.

Para la consecución de nuestro objetivo, seguiremos también muy de cerca, respecto a las boticas embarcadas en flotas, una relación pormenorizada que nos proporciona Ladero Quesada (3), y que describe algunas de ellas en buques pertenecientes a varias de las numerosas expediciones y viajes de los habidos en el s. XV, y el primer cuarto del s. XVI, o sea, hasta la expedición de Magallanes

y Elcano. Con todo lo descrito, disponemos así de la relación basada en la documentación examinada por Ladero (4) y previamente por la investigadora inglesa Alice Gould en los primeros años del s. XX. Nuestro estudio detallado de la documentación sobre los remedios embarcados en las expediciones nos permite aportar analogías, concordancias y diferencias, a la búsqueda de incrementar el conocimiento sobre el particular. Aunque el literal de los inventarios es conocido, es novedoso nuestro aporte al hacer un estudio comparativo entre ellos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODO

Hemos partido de la búsqueda de las fuentes históricas primarias conservadas en el Archivo General de Indias de Sevilla. Estos se han consultado de manera digital a través del Portal de Archivos Españoles (PARES). Asimismo, hemos completado la investigación con libros, artículos científicos, o comunicaciones científicas en Congresos.

Los puntales claves analizados son una serie de cinco inventarios de materiales y productos de botica que se encontraban inmersos en los diversos viajes, como son: la expedición de Juan de Aguado de 1495, la expedición de Pedrarias Dávila en 1513, el inventario de Fray Luis de Figueroa 1516, el inventario Hernando de Torres en 1512 para Puerto Rico y, por último, los remedios embarcados en la primera circunnavegación de la tierra por Magallanes — Elcano en 1521. Tras su examen, se ha confeccionado una exhaustiva tabla Excel para sacar conclusiones de una forma transversal y fluida, todo ello soportado como es lógico con un estudio bibliográfico *ad hoc*.

## 3. DISCUSIÓN

La historia de las primeras exploraciones españolas al Nuevo mundo habidas a caballo del s. XV y XVI, pasa por los siguientes nombres sobradamente conocidos: Cristóbal Colón, Alonso de Ojeda, Diego de Lepe, Alonso de Ojeda, Pedro Alonso Niño, Vicente Yáñez Pinzón, Diego de Lepe, Alonso Vélez de Mendoza, Rodrigo de Bastidas, Alonso de Ojeda, Nicolás de Ovando, Diego de Nicuesa, Diego Velázquez de Cuéllar, Juan Ponce de León, Juan Díaz de Solís y - tras la muerte de este - su cuñado Francisco de Torres, Francisco Hernández de Córdoba, Juan de Grijalva, Hernán Cortés, hasta finalmente Fernando de Magallanes y Juan Sebastián Elcano a la muerte del primero.

Cada una de estas expediciones, y otras, tuvieron un denominador común: especias y oro, o por el contrario, oro y especias. Fueron estas las dos obsesiones (5) para el retorno económico de las expediciones, las cuales eran a tercio de tipo militar, económico



y religioso. Así lo indican las prosas concisas, tersas y elegantes de los Cronistas de Indias, las de Fernández de Oviedo, Bernal Díaz del Castillo o de López de Gómara.

Respecto al oro es bien conocida la recomendación de Fernando II de Aragón: *"Logra oro, humanamente si es posible. Pero consigue oro a cualquier precio"*. También se debe a Fray Bartolomé de las Casas la cita que indica que:

*"Cundiera la fama de que se pescaba oro en Tierra Firme y para ir a pescarlo casi toda Castilla se movió"*.

De esta forma (6), podemos leer en cualquiera de las crónicas de Indias:

*"Tomaron seiscientas personas, discurrieron por la costa, pensando rescatar oro; entraron en el golfo de Urabá, y en un arenal halló Juan de la Cosa oro, que fue lo primero que de allí se presentó al rey. Llevaban muy llenos de gente los navíos; dieron vuelta a Santo Domingo, que ni hallaban rescate ni mantenimiento"*.

De otro lado, las especias tenían un precio desorbitado en cualquiera de las Ferias de Castilla, usándose como moneda de trueque y llegando a afirmarse de un hombre rico que era *"una bolsa de pimienta"*. El sobre valor alcanzado (7) por la especiería en su transporte entre las Molucas y Sevilla llegó a cifrarse en 70 veces.

Y es que es en la conquista de las "Islas de las Indias", o su paso hacia ellas posteriormente, cuando Núñez de Balboa en 1515 contempla desde la cordillera del Darién el mar que existe al otro lado, cuando los españoles dejan de pensar en América como un conjunto de islas sueltas. Comprenden entonces que se trata de un continente y buscan con afán el paso que habría de conducirlos al Oriente milenario.

Colón se había hecho a la vela buscando agrandar Castilla en tierras y mar. Y con él la larga saga de tripulaciones, hombres y preparos. Magallanes y Elcano completan la aventura, logrando llegar, con el concurso de Cortés y Pizarro, al doble objetivo pretendido en el plano económico. "Oro y especiería" se pregonaba (8) en los banderines de enganche de las costas sur de España para enrolarse en las expediciones. En ellos se prometía *"el tintineo de los doblones y el esplendor de las especias"*.

A la búsqueda de todas esas riquezas fabulosas y, para ensanchar los límites de la conquista de almas para Dios y la religión católica, se fueron aparejando naves y la Corona se echó al mar. Pero no solamente ocurrió un hecho social y económico, en palabras de Marañón (9) *"los españoles fuimos a América con un ansia de aventura, codicia y lucro, pero en mayor medida para conocer"*. Fruto de ese anhelo, de esa ambición de conocimiento, fue el relevante incremento que las plantas americanas supusieron para la terapia de Occidente (10).

Fue un tiempo para el que Pedro Mártir de Anglería acuñó su conocida frase *"Nihil jam Hispania Arduum"*, que vertido al romance dice: *"Para España no hay ya nada imposible"*.

Así las cosas, nos corresponde hoy seguir intentando implementar y aunar conocimientos sobre el aspecto que nos compete, ya que la historia de la Farmacia (11) puede ser definida como *"todo lo concerniente a los aspectos profesionales, en sus vertientes institucionales, corporativas, sociológicas, económicas, legales, culturales, biográficas o bibliográficas y todo lo tocante al sustento científico y tecnológico de su actividad, en tanto tenga relación, directa o indirecta con el diseño y la elaboración de los medicamentos o con las aspiraciones del ser humano enfermo respecto a la virtud curativa de los fármacos"*. Y es que todas las expediciones, al ser participadas en gran medida por la Corona, nos han dejado un importante rastro documental visible en los archivos españoles, particularmente en los legajos pertenecientes a la Casa de Contratación conservados en el Archivo de Indias, como ya hemos puesto de manifiesto.

Podemos tener conocimiento de la concomitancia de los medicamentos con las exploraciones y viajes desde el primer viaje de Colón, con la aparición de la almáciga (12):

*"Estando así vino el contramaestre de la Niña a pedir albricias al Almirante porque había hallado almáciga, mas no tría la muestra porque se le había caído. Prometióselas el Almirante y envió a Rodrigo Sánchez y a Maestre Diego a los árboles y trajeron un poco de ella, la cual guardó para llevar a los Reyes y también del árbol; y dice que se conoció que era almáciga, aunque se ha de coger a sus tiempos, y que había en aquella comarca para sacar mil quintales cada año"*.

No obstante lo anterior, no será nuestra misión hoy detenernos en el descubrimiento y explotación de las plantas medicinales americanas, de cuyo uso y virtudes hace relación el poeta Castellanos en su Elegía de varones ilustres de Indias:

*"Que de yerbas halló grandes secretos  
Con cuya propiedad a la continúa  
Obraba salutíferos efectos"*

O también Castillejo:

*"Guayaco si tu me sanas  
Y sacas de estas pendencias  
Cantaré tus excelencias  
Y virtudes soberanas  
Dulcemente..."*

Sino, por el contrario, en lo que guarda relación con los botiquines estibados para uso en las propias naos o en las factorías y fuertes de las primeras poblaciones.

Nuestro primer documento a analizar se encuentra incluido en la documentación de referencia que formaba parte de la expedición capitaneada por Juan Aguado (13) (nº 1 en la relación



de Armadas antedicha). En palabras de Arranz Márquez, "Aguado, capitaneando cuatro carabelas bien surtidas de trigo (14), cebada, bizcocho, vino, vinagre, aceite, tocino, queso, pescado seco y habas salió del puerto de Sevilla el 5 de agosto de 1495 y llegó a la Isabela en el mes de octubre". A continuación facilitamos un fragmento de la transcripción de este inventario:

"Enplasto de diageminis,	12 onzas, a 70 m. la libra
Costra çidra,	11 libras y 2 onzas, a 46 m. la libra
Sen (o mien),	1 libra, a 100
Tamarindos,	3 onzas, a 10 la onza
Turbití,	3,5 onzas, a 31 la onza
Adzarí,	2 onzas, a 10 la onza
Sangre de drago de gota,	2 onzas, a medio real la onza
Coloquetida,	8 onzas, a 350 la libra
Asafetida,	4 onzas, a 6,5 la onza
Cera pini,	2 onzas, a 62 la onza
Ruybarbaro,	2 onzas, a 186 la onza"
[...]	

La transcripción (15), de Ladero Quesada de esta botica enviada en 1495 nos implementa la adquisición de los simples y compuestos tratados por el Maestre Jerónimo.

Por el mismo investigador, también sabemos de la existencia de otro inventario de botica en la expedición de Nicolás de Ovando que partió de Cádiz en 1502 y que transportaba no menos de dos mil quinientas personas a modo de colonos. La flota estaba compuesta por 32 embarcaciones hacia La Española, siendo la Armada más grande hasta la fecha con destino a Indias y estuvo sufragada esencialmente con capital privado.

A partir de ese momento, como el caso de Diego Colón en 1509 (16), siguieron sucediéndose expediciones que arribaban a Indias con las características propias y otras comunes que introdujimos en el principio de este artículo.

Ahondamos ahora en los pormenores de otro documento de botica. Se trata del que puso de manifiesto Mena en su documentado trabajo en torno a la Expedición de Pedrarias Dávila a Castilla del Oro en 1513 (17), y que figura como nº 19 en la relación de Armadas que propone Ladero y de cuyos gastos tomó nota el Tesorero de la Casas de Contratación Sancho de Matienzo el mismo año (18).

Para este inventario sí sabemos del boticario preparador y al físico encargado de hacer el seguimiento del viaje. Se trata del boticario Solórzano y del físico Barreda, que percibieron doce reales por su trabajo en el aprecio y examen de los géneros de la botica (19). Sobre Barreda, se le avala y recomienda para formar parte de la expedición (20) y de le dotan de doce mil maravedíes para ayudas de coste de su pasaje (21).

A continuación, transportamos un fragmento de este inventario que está la monografía de referencia y donde figuran las unidades para cantidades y el correspondiente precio en maravedíes:

<i>"Emplastos (en libras)</i>		
<i>Oxinozo</i>	2	544
<i>Granadei</i>	2	320
<i>Apostolicon</i>	1	
<i>Degenis</i>	7	952
<i>Estomaticon</i>	2	544
<i>Diaquinilon</i>	-	50"
[...]		

Adicionalmente a todo lo anterior, está documentada otra botica en el flete debido a Fray Luis de Figueroa y los frailes jerónimos que le acompañaron, que llevaron otra, en 1516 (nº 1446 de la cuenta de Matienzo). El fraile inició su aventura en el Nuevo Mundo el 20 de diciembre de 1516, cuando partió rumbo a La Española junto con otros dos compañeros, fray Alonso de Santo Domingo y fray Bernardino de Manzanedo. En esta ocasión para corregir los abusos detectados por el padre Bartolomé de las Casas por el poder de los encomenderos.

El inventario, que también referencia Ladero, se conserva, igual que los anteriores, en el Archivo General de Indias de Sevilla. Veamos un fragmento (*Sic*):

*"Las cosas que se compraron de botica por mano de Gerónimo Baron, boticario, son las siguientes:*

<i>5 azumbres de agua rosada, a 2 reales el azumbre (22)</i>	340
<i>13,5 libras de azúcar rosada</i>	540
<i>28 libras de carne de membrillo, a real la libra</i>	952
<i>Media libra de pimienta</i>	50
<i>Media libra de canela</i>	210
<i>Media libra de clavos</i>	220
<i>4 onzas de azafrán</i>	150
<i>4 onzas de jengibre</i>	25"
[...]	

Toca ahora hacer mención aquí al inventario de botica de la Armada de Magallanes (23), nº 23 en la relación de Armadas que expone Ladero (24). Los remedios de la expedición han sido estudiados a fondo por los autores Venegas Fito y Ramos Carrillo en una monografía específica. Los 70.000 kilómetros recorridos, y los 1.100 días de navegación nos hablan por sí solos de su importancia, en una expedición que, en palabras de Elcano, fue la primera en "recorrer y descubrir toda la redondez del mundo". La expedición embarcó con provisiones para dos años, y las "cosas de botica" viajaron en la Trinidad, la nao capitana.

Así, para dar uniformidad al texto, ofrecemos al lector un breve párrafo de este inventario (Si):

*"Relación de las medicinas y conserbas y aguas y azeytes y laxativos y cordiales y synples y otras cosas que se compraron de Johan Bernal boticario:*

*Ungüentos: un bote de cada uno, con diversos pesos y precios, según el siguiente detalle:*

<i>Diaçianino</i>	<i>1 libra 14 onzas</i>	<i>170</i>
<i>Ungüento conservativo</i>	<i>2 libras</i>	<i>272</i>
<i>Diacatolicon</i>	<i>15 onzas</i>	<i>476</i>
<i>Diarodon</i>	<i>1 libra</i>	<i>200</i>
<i>Diafenicon</i>	<i>1 lib. 14 onz.</i>	<i>340"</i>
<i>[...]</i>		

Finalmente, descollamos ahora la botica del sevillano Hernando de Torres, considerado el primer boticario (25) llegado con Real Aprobación para establecerse con drogas, medicamentos y utilaje farmacéutico en América en la isla de Puerto Rico en 1512 (26). Ofrecemos a continuación un brevísimo fragmento del inventario (Si):

*"1 libra de ungüento estomaton en 2 ts.; 4 libras de jarabe eupatorio en 1 po.; 4 libras de jarabes de raíces en 4 ts.; 4 libras de jarabe de arrayán en 4 ts.; 1 libra de jarabe de fumusterra en 2 ts.; 4 libras de miel rosada colada en 4 ts."*

*[...]*

De otro lado, están las drogas de procedencia americana que hacían el viaje de ida y vuelta, como el ruibarbo de indias (27), la cañafistula o el Drago (28), todas ellas anotadas por Monardes. Por la época estudiada no tienen presencia otras tres drogas americanas de enorme interés como la quina, la coca o el curare. Para el caso de la quina, habría que esperar la presencia de Juan de Vega, y su introducción de la planta procedente del Perú en 1640 (29).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los simples vegetales más destacados en los inventarios de Aguado, Pedrerías Dávila y Figueroa en el marco de 1495 a 1516 son el azafrán, la pimienta, la canela, el clavo y el jengibre. Las especias, como es sabido, volvieron a España en el tornaviaje de Elcano pero ya se usaban y eran muy preciadas, de ahí el ahínco comercial en conseguirlas en la expedición de Magallanes y Elcano.

También la sangre de drago y el amoniaco se encontraba en tres de los inventarios inspeccionados: Aguado, Pedrerías Dávila y Hernando de Torres.

Desde el punto de vista pecuniario, hemos de subrayar dos simples vegetales de elevado precio; el ruibarbo y la escamonia, estando presente en la documentación de Aguado, Pedrerías Dávila y en el inventario de la botica de Hernando de Torres para Puerto Rico. Su importe por 1 libra de la escamonia corresponde a 1.125 maravedíes, y de ruibarbo a 4.500 maravedíes.

Por otro lado, las violetas se encontraban dentro de nuestros cinco inventarios examinados. La cantidad presente aproximada en común era de 1 libra equivalente a 450 gramos con un coste de 100 maravedíes por cada libra. Las rosas secas se encuentran en tres de nuestros cinco inventarios, fluctuando la cantidad entre 1 libra en dos de los inventarios y de 4 libras en el de Pedrerías Dávila. Por cada libra tenía un coste de 100 maravedíes.

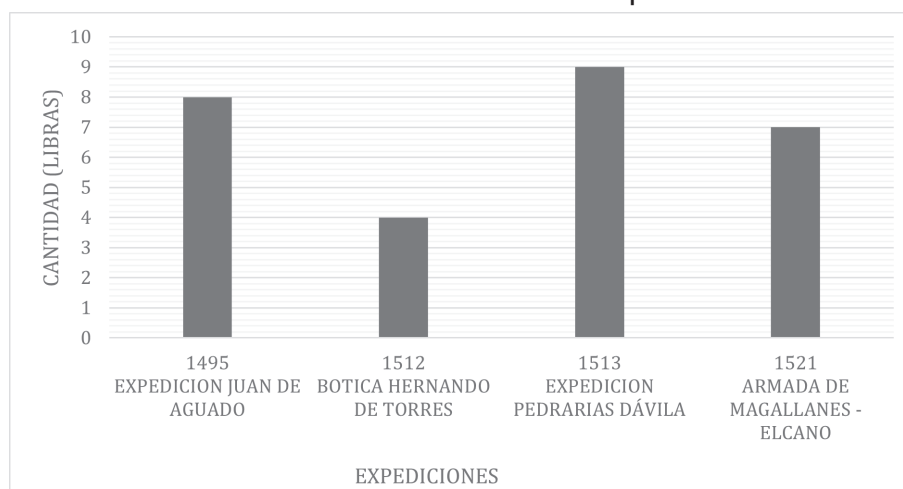
Por último, resaltar en este apartado de los simples vegetales, el incienso (fumigatorio, en aceite se empleaba en reumatismo), adscrito a Pedrerías Dávila, Hernando de Torres y Magallanes-Elcano, con un importe de 80 maravedíes por libra de incienso. La cañafistula (*Cassia fistula*, purgante) que está presente en la expedición de Pedrerías Dávila, en el inventario de la botica Hernando de Torres y en la expedición de Magallanes - Elcano, con un precio de 200 maravedíes por cada libra.

Respecto a simples minerales, el alumbre de roca (sulfato doble de aluminio y potasio, contra las hemorragias) se encuentra en todos los inventarios, salvo en el de Figueroa, con un precio de 10 maravedíes por cada libra. Son altas las cantidades que se transportaban en las expediciones con una media de 6 libras, equivalente a 2700 gramos, si comparamos con otras especies vegetales o animales. Es llamativa la conserva de carne de membrillo presente en las cuatro expediciones en este formato ya que mejora la conservación evitando que se estropee, sobresaliendo de manera en la Pedrerías Dávila con 500 libras respecto al resto de expediciones.

En lo tocante a los medicamentos simples, resaltamos el aceite de almáciga (el aceite se hace a partir de la resina del lentisco, se emplea para fortificar las encías y perfumar el aliento) y el aceite de asensios (es el ajeno, *Artemisia absinthium*). Ambos forman parte de los aceites más utilizados, después de estos, el aceite de eneldo (carminativo y anodino, se puede usar en fricciones), el de alcapparras, el de manzanilla (en fricciones para los dolores artríticos) y el rosado (aceite de rosas pálidas).

Los jarabes tenían una elevada presencia en los inventarios por su conservación y facilidad de dosificación del fármaco. Los más presentes son *el jarabe de fumoterre (Fumaris officinalis; diurética y sudorífica)*, la *miel rosada colada* (a base de miel y zumo de las rosas. Para úlceras de la boca, en gargarismos o colutorio) y *jarabe de asensios*. En el inventario de la expedición de Juan de Aguado, se transportaban jarabes en grandes cantidades como los siguientes: *el jarabe de menta composita* con 12.5 libras, *jarabe de escolopendra* con 11 libras, *jarabe aceitoso de cidra* con 11 libras

**Tabla 1.** Relación de cantidades en libras de miel rosada colada durante las distintas expediciones.



(*Citrus medica*. Según Jourdan, lleva corteza, aceite y zumo de cidra y azúcar. Es atemperante, estimulante y diurética). Por otro lado, en la expedición de Pedrarias Dávila también se hace presente los jarabes trasportados en altas cantidades como: *jarabe de eupatorio* (para la flema), *jarabe de arrayán* (lleva flores de arrayán o mirto), *jarabe de borrajas* (se usaba como diaforético) y *jarabe de cantueso* (lleva espigas de cantueso), entre otros. Todos ellos con una media de 10 libras equivalente a 4500 gramos, y con un precio aproximado de 400 maravedíes cada uno.

Insistir en los más repetidos en nuestros inventarios, la miel rosada colada tuvo una fluctuación en sus cantidades presentes en las diferentes expediciones en nuestro estudio como observamos a continuación en la tabla 1.

Los polvos y emplastos están menos presentes en los inventarios, siendo el más destacable el *polvo de diamargaritón frígido* (lleva perlas. Sirven para fortificar el corazón, cabeza y estómago y purifican los humores) con menos de 1 libra en las diferentes expediciones. Respecto a los emplastos, podemos destacar el *emplasto diaquilón* (lleva, según Joseph Jacob Ritter, litargirio y aceite de oliva, mucílago de semilla de alholva, semilla de lino y

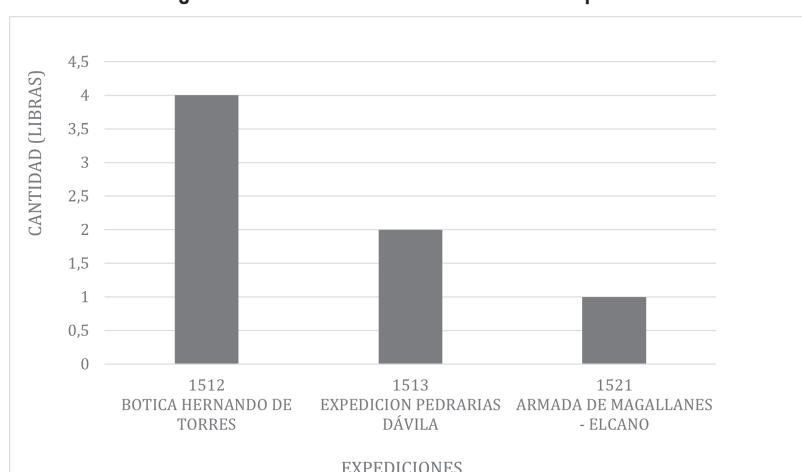
raíz de malvavisco. Al ser emoliente, sirve para ablandar humores que inclinan a la supuración) (31).

En cuanto a los ungüentos en general, están más presentes en la expedición Magallanes-Elcano, en la de Pedrarias Dávila y en la botica de Hernando de Torres, siendo los más patentes el *ungüento de hisopo húmedo* (se extrae de la lana de las ovejas), *ungüento de agripa* (lleva brionia y lirio. Es resolutivo. Resuelve los tumores edematosos, cura las contracciones de los nervios y untado en el vientre, mejora las obstrucciones del bazo), *ungüento apostolorum* (lleva doce remedios en una analogía con los doce apóstoles, para fístulas y escrófulas) y el *ungüento sandalino* (es el ungüento rosado de sándalos, para las inflamaciones almorranas y dolores de junturas).

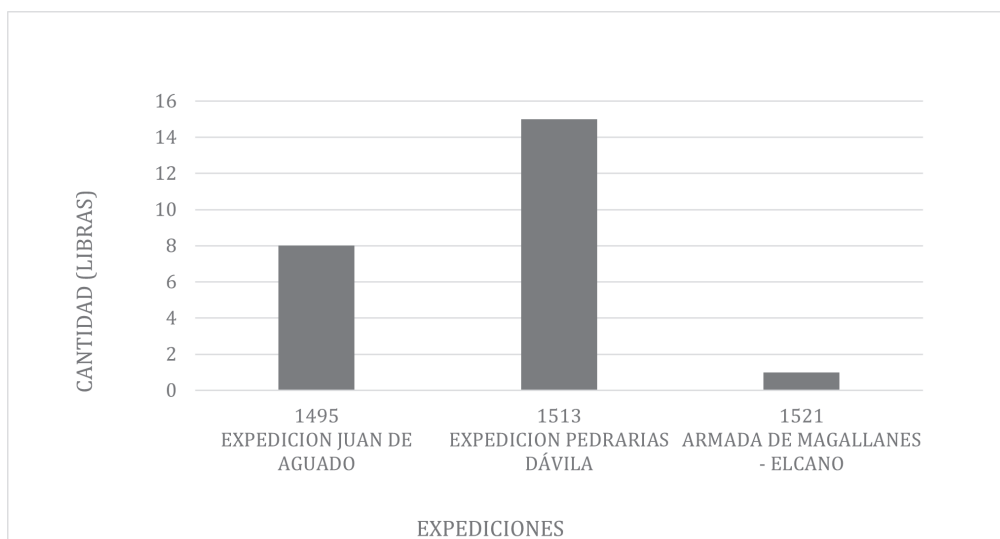
A continuación, mostramos dos figuras en las que observamos la evolución temporal de los ungüentos más presentes en nuestros inventarios: *sandalino* y *apostolorum*. Tabla 2.

Por último, de los medicamentos compuestos analizaremos las píldoras y los laxativos. Las *píldoras de cochias* (Según Luis de Oviedo son purgativas. Para los humores del estómago causa de males. También en dolores de cabeza) y *agregativas* (Oviedo ex-

**Tabla 2.** Relación de cantidades en libras de ungüento sandalino durante las distintas expediciones.



**Tabla 3.** Relación de cantidades en libras de *ungüento apostolorum* durante las distintas expediciones



presa que lleva coloquíntida, zumo de ajeno y de eupatorio y es también purgativa para evacuar los malos humores) (32) están presentes en el marco temporal desde el 1495 hasta la botica de Hernando de Torres en 1512, pero ya no se encuentra en nuestros inventarios más adelante de este periodo. Se transportaban alrededor de 85 gramos en todas ellas con un precio de 70 maravedíes aproximadamente.

Los laxativos se hacen notar en la expedición de Pedrarias Dávila, en cambio para los demás inventarios destacamos la *dialaca* (confección purgante), *micleta* (lleva mirabolanos entre otros, es una confección astringente para las diarreas) y el *diafenición* (confección de dátiles. Se utilizaba para confortar el hígado, el estómago y quitar los vómitos). Se transportaban alrededor de 300 gramos con un precio de 200 maravedíes aproximadamente.

Finalmente, cabe destacar la gran presencia de conservas

y cantidad transportada, siendo la mayor la carne de membrillo llegando las cifras hasta 500 libras en la expedición de Pedrarias Dávila con un precio de 17.000 maravedíes.

No obstante, hay más remedios que se repiten en dos de nuestros inventarios como la *triacá* (calmante, antídoto, tónico, una especie de panacea universal), jarabe rosado (con rosas, para el estómago y los flatos), atutía (óxido de cinc. En enfermedades oculares), cardenillo (llamado también verdete es el acetato básico de cobre, es escarótico), raíz de sen y tamaros indios, *ungüento resuntivo* (lleva salvia, ajeno, cariofilada, menta, sabina y marrubio blanco y negro, lavándula y melisa entre otros simples, es una unguenta suave pectoral) o el *aceite de eneldo* (Según Jourdan, Farmacopea Universal: carminativo y anodino en fricciones).

Y, por último, como ejemplo de los que sólo están en un inventario: el ya citado *jarabe de borrajas* (depurativo, sudorífico y

**Tabla 4.** Ejemplo de una fracción del Excel usado

Ungüentos	Juan de Aguado 1495	Hernando de Torres 512	Pedrarias Dávila 1513	Fray Luis de Figueroa 1516	Magallanes – Elcano 1521
Blanco		8 libras	15 libras (1.200 mrv)		2 libras (136 mrv)
Estomacón		1 libra	3 libras (480 mrv)		
Sandalino		4 libras	2 libras (320 mrv)		1 libra (170 mrv)
Hisopo unido	1 libra (100 mrv)	8 libras	2.5 libras (212,5 mrv)		
Apostolorum		8 libras	15 libras (2.400 mrv)		1 libra y 13 onz (200 mrv)





diurético, por las propiedades de la flor de borraja), *jarabe de adormidera*, *polvos de tierra sigillata* (es la tierra sellada, arcilla empleada para las escoriaciones, secar o cicatrizar), *ungüento marciatón* (Según A. Baume, lleva raíz de valeriana, de bardana, ajeno, laurel, comino, manzanilla, hipericón, entre otros. Se empleaba frotando la zona afectada para fortificar los nervios y las articulaciones, resuelve humores fríos y calma humores reumáticos), *ungüento jirapliega* (electuario purgante compuesto de acíbar, miel clarificada y otros ingredientes), laxativo diacartamo (para purgar la flema), *emplasto estomacón* (lleva estoraque y almáciga, incienso y trementina, entre otros ingredientes. Se aplicaba en el estómago), *píldoras agaricón* (de agárico. Para purgar la flema), y las píldoras áureas (se decía que purgan la cabeza y aumentan la vista). De la misma forma, el *jarabe de orozuz* (*Glycyrrhiza glabra*, expectorante), el *jarabe almíbar*, ya citado el *jarabe de arrayán* (o mirto, el jarabe está hecho con las flores, agua y azúcar), jarabe de hisopo, jarabe escolopendra (para cálculos del riñón). *Aceite de llantén* (es el plantago. Se usaba como vulnerario y estíptico débil) y el *aceite de azahar*.

## 5. CONCLUSIONES

La necesidad de curar estuvo patente desde los inicios de las travesías marítimas expediciones y descubrimientos formando parte de la flota de las naos y carabelas. Es patente el envío de fármacos en tres facetas: para curar a los marineros en las expediciones, para conformar boticas a la llegada a tierra y para el puro comercio.

Presenciamos una revolución botánica americana con la introducción de nuevas plantas y también fármacos a la terapéutica de las enfermedades en la España del siglo XVI derivado de un inusitado optimismo propio de la avidez pecuniaria de sagaces comerciantes médicos y farmacéuticos, y a la par sanitaria, en una desbocada incorporación de estos remedios al arsenal terapéutico de la época, en un continuo flirteo entre ciencia y comercio. Lo anterior es completado con la farmacoterapia típica galenista y con los remedios químicos de Paracelso. Todo lo cual es constatable en los inventarios analizados.

La relación de los remedios que más se repiten en los inventarios es absolutamente consecuente con la forma de entender la medicina y la farmacia en esta época. Destacamos el *ungüento sandalino*, el *apostolorum*, el *hisopo húmedo*, el *almirón* y el *alumbre de roca*. De los productos que más cantidad están presentes en los inventarios es la miel rosada, la carne de membrillo y el aceite rosado. El inventario que más productos de botica posee es el inventario de Pedrarias Dávila.

La presencia en los inventarios de las especias del tipo de las aportadas por Magallanes y Elcano en su expedición, determinan

su uso frecuente en la época a pesar de su alto valor de comercialización, hecho que nos habla de la importancia conferida a estas, a la vez que la relevancia de su traída por una ruta alternativa a los tradicionales caminos conocidos como ruta de la seda o de las especias.

## 6. REFERENCIAS

1. Venegas CJ, Ramos A. La botica en la Expedición de Magallanes y Elcano. 1ª ed. Madrid: Taberna Librería, Academia de Farmacia de Castilla y León, 2020.
2. Toral E, Ramos A, Venegas CJ. El mortero emigrante. Crónica de los primeros boticarios españoles que pasaron a Indias. *Temas Americanistas* 2022, (48): 340 - 66. Disponible en: [https://revistascientificas.us.es/index.php/Temas\\_Americanistas/article/view/17911](https://revistascientificas.us.es/index.php/Temas_Americanistas/article/view/17911).
3. Ladero MA. Las Indias de Castilla en sus primeros años. *Cuentas de la Casa de la Contratación (1503-1521)*. Ed. Madrid: Dykinson 2008: pp. 202-208
4. Archivo General de Indias (AGI). Contratación, Leg. 3249, con datos sobre 'Armadas' de Juan Aguado, Juanito Berardi, tercer viaje de Cristóbal Colón y envío de Francisco de Bobadilla, entre 1495 y 1500. Leg. 3251, 'viaje a La Especiería' de 1508, y envío de una carabela a La Española de la que fue por maestre Cristóbal Vizcaíno. Leg. 3252, Armada de Juan de la Cosa en 1507 para guarda de las naos que venían de Indias. Leg. 3253, Armada de Pedrarias Dávila, enviada a Castilla del Oro, 1513-1514, estudiada con todo detalle por Mena García (1998). Leg. 3254, proyecto de viaje de Juan Díaz de Solís a Malaca. Leg. 3255, gastos para la expedición de Magallanes (años 1518-1519)".
5. Ladero MA. El primer oro de América: Los comienzos de la Casa de Contratación de las Indias (1503-1511) Ed. Madrid: Real Academia de la Historia 2002.
6. López de Gomara F. Historia general de las Indias (1552). cap. LXX, Madrid: Calpe 1992; p. 167.
7. Pérez - Mallaina PE. Los Hombres del Océano. Sevilla: Diputación de Sevilla 2021; p. 168.
8. Venegas Fito CJ. Oro y especiería. *Diario HOY*. 2021; p. 27.
9. Riquelme y Salazar, J. Médicos, farmacéuticos y veterinarios en la conquista y colonización de América. Madrid; 1950.
10. El descubrimiento de América y su repercusión en la sanidad de los habitantes de Europa. Archivo Iberoamericano de Historia de la Medicina y de Antropología Médica: Madrid 1956.
11. Puerto FJ. Ciencia y farmacia en la España decimonónica. *Revista Ayer* 7: 1992; p. 153
12. Diario del Almirante del lunes 5 de noviembre de 1492. Texto del manuscrito de la Biblioteca Nacional correspondiente a la pluma de Bartolomé de las Casas. Vis. Signatura: Vitr/6/7 PID.



- Bdh000049660. V.a.Mss/10255. Copia finales del siglo XVI.
13. Archivo General de Indias. Contratación, Libro de armadas 3249, f. 34 y 36-37.
14. Arranz L. Juan de Aguado. Diccionario Bibliográfico Real Academia de la Historia. Disponible en: <https://dbe.rah.es/biografias/35536/juan-de-aguado>.
15. Ladero MA. Primeros viajes a Indias según los Libros de Armadas 1494-1502. Boletín de la Real Academia de la Historia, CCXV /1, 27-109; pp. 68 - 70.
16. Otte E. La flota de Diego Colón. Españoles y genoveses en el comercio trasatlántico de 1509. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Revista de Indias: 1964; pp. 97-98, p. 481.
17. Mena MC. La primera botica del Nuevo Mundo en Sevilla y las flotas de Indias. La gran armada de Castilla del Oro (1513-1514). Sevilla: 1998, pp. 334-342.
18. Libro de cuenta del gasto de la armada que fue a Castilla del Oro a cargo de su gobernador Pedrarias Dávila, dada por el tesorero de la Casa de Contratación Sancho de Matienzo. Archivo General de Indias. Signatura, Contratación, 3253, L.1.
19. Archivo General de Indias, Contratación, 3253. Fol. 146 vuelto.
20. Archivo General de Indias, Panamá, 233, L.1, F.129R y Panamá, 233, L.1, F.129R-129V
21. Archivo General de Indias, Panamá, 233, L.1, F.124V-127R
22. En nº 477, año 1508, de la cuenta de Matienzo, agua rosada a 170 mrs. el azumbre (5 reales)
23. Botica embarcada en la armada de Magallanes. Se asienta el pago el 26 julio 1519. Archivo General de Indias. Contratación, libro de armadas 3255, f. 95 v. a 96 v.
24. Ladero MA. El abastecimiento de la Indias a comienzos del siglo XVI. Boletín de la Real Academia de la Historia. Tomo CCIII. Cuaderno III. Septiembre - diciembre. 2006; p. 289.
25. Ramos A, Moreno E, Fábregas, SM. Hernando de Torres: An Almost Unknown Apothecary Fundamental in the History of the World Pharmacy. Congreso. 44 th International Congress for the History of Pharmacy. Washington DC, Estados Unidos: 2019.
26. Torres L. Breve historia de la Sanidad en Puerto Rico durante el periodo colonial español. Revista Salud y Cultura 1992. No.5. Nydia M. King. Datos históricos y comentarios sobre la profesionalización de la farmacia en Puerto Rico. Revista Salud y Cultura 1992. No. 5: 82; Arana S. Catálogo de Farmacéuticos de Puerto Rico (1512-1925). San Juan, Puerto Rico 1985; pp. 211; Tanodi A. Documentos de la Real Hacienda de Puerto Rico. Vol. 1. (1510-1519). Centro de Investigaciones Históricas Universidad de Puerto Rico: San Juan 1971; pp. 151 — 152.; Massons JM. Historia de la Sanidad Militar Española (Tomo 1). Barcelona 1994; pp. 83.
27. Fábregas S. Puerto Rico: escenario de la primera farmacia de América. Cultura 2002, 6(13): 3 — 10.
28. Fábregas S. Comentarios en torno al estado de la medicina en América en el periodo de 1492 a 1700 - El caso de Puerto Rico. Centro de Estudios de Puerto Rico y el Caribe: San Juan, Puerto Rico 1996; Zeno FM. Historia de la Capital de Puerto Rico. Publicación Oficial del Gobierno de la Capital: San Juan, Puerto Rico 1957.
29. Lastres JL, López G. Aportaciones acerca del uso terapéutico de la quina y de las disputas de los botánicos de finales del siglo XVIII. Moreno Toral E, Antonio Ramos Carrillo A, González Bueno A (eds). Ciencia y profesión: el farmacéutico en la historia. Sevilla 2018; p. 53.
30. Jourdan AJL. Farmacopea universal o Reunión comparativa de las farmacopeas de Ámsterdam [...] Madrid: Imprenta de Don Ramón Verges 1829; p. 104.
31. Ritter JJ. Farmacología quirúrgica o Ciencia de medicamentos externos e internos para curar las enfermedades de cirugía. Madrid: Imprenta de Don Fermín Villalpando 1819; p. 490.
32. Oviedo L. Methodo de la colección y reposición de las medicinas simples, y de su corrección y preparación. Madrid: Oficina de Melchor Álvarez 1595; pp. 257-262.
33. Quintanilla M. Breve compendio de cirugía. Valencia: layme de Bordazar 1705; p. 270.

Si desea citar nuestro artículo:

**Las Boticas del Mar.**

**Inventarios de boticas embarcadas en la carrera de Indias**

Cecilio Venegas Fito

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 88. nºextra (2022). · pp. 693-701

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.30>





