INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES

de la REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

2005

VOLUMEN LXXII Núm. 4 Publicación trimestral

Domicilio de la Academia
FARMACIA, 11 • 28004 MADRID

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 765-782

Revisión

Old hormones of the insulin family as new developmental signals

FLORA DE PABLO[*, 1], CATALINA HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ[1], CARLOS VICARIO-ABEJÓN[1, 2] AND ENRIQUE J. DE LA ROSA[1]

[1] *Group of Growth Factors in Vertebrate Development, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).*

[2] *Instituto Cajal (CSIC, Madrid)*

ABSTRACT

Insulin was first identified as an anabolic pancreatic hormone responsible for glucose homeostasis, and Insulin-like Growth Factor (IGF-I) as the mediator of the action of Growth Hormone on postnatal growth. New molecular, pharmacological and embryological information has broadened the scope of the physiological roles of these hormones and their related molecules, particularly the insulin precursor proinsulin, during vertebrate development. Studies in our laboratory have demonstrated that proinsulin is expressed and functional before emergence of the pancreas. Proinsulin gene expression in the chick and mouse embryo shows fine transcriptional and postrancriptional regulation with generation of specific embryonic transcripts which are differentially translated. The protein product remains as unprocessed proinsulin that protects the cells from excessive apoptosis during neurulation. In contrast, IGF-I is expressed later than proinsulin in the chick embryo and it starts in the nervous system. In the mouse embryo, generation of olfactory bulb stem cells in culture has allowed the study of these molecules' role in the proliferation and differentiation of neural precursors. Proinsulin and IGF-I can cooperate with mitogens (EGF and FGF2) in the control of stem/precursor cells proliferation and IGF-I is an essential factor for neural differentiation. Mice deficient in IGF-I present a disruption of olfactory bulb cytoarchitecture, with decreased numbers of mitral cells and abnormal radial glia. This article gives thus an overview of the important role of insulin family proteins in development.

* Toma de Posesión como Académica Correspondiente, 4 de noviembre de 2004.

Key words: Proinsulin.—Insulin-like growth factor I.—Embryo.— Stem cells.—Neurogenesis.

RESUMEN

Hormonas tradicionales de la familia de la insulina como nuevas señales en el desarrollo

La insulina fue identificada como una hormona anabólica pancreática, responsable de la homeostasis de la glucosa, y el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo I (IGF-I) como el mediador de la acción de la Hormona de Crecimiento postnatalmente. Nuevas informaciones moleculares, farmacológicas y embriológicas han ampliado el concepto del papel fisiológico de estas hormonas y sus moléculas relacionadas, particularmente del precursor de la insulina, la proinsulina, en el desarrollo de vertebrados. Los estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la proinsulina está expresada y es funcional antes de que aparezca el páncreas. La expresión de proinsulina en los embriones de pollo y ratón muestra regulación transcripcional y post-transcripcional muy fina, con la generación de transcritos específicos embrionarios que se traducen de formas distintas. El producto de estos mRNAs se mantiene como proinsulina sin procesar, que protege a las células de la apoptosis excesiva durante la neurulación. En contraste, el IGF-I está expresado más tarde que la proinsulina en el embrión de pollo y comienza en el sistema nervioso. En el embrión de ratón, la generación de células madre neurales en cultivo ha permitido estudiar el papel de estas moléculas en la proliferación y diferenciación de precursores neurales. La proinsulina y el IGF-I pueden cooperar con los mitógenos (EGF y FGF2) en el control de la proliferación de células madre/precursores mientras que el IGF-I es un factor esencial para la diferenciación neural. Los ratones deficientes en IGF-I presentan alteración de la citoarquitectura del bulbo olfatorio con disminución del número de neuronas mitrales y glía radial anormal. Este artículo da una visión global del importante papel de las proteínas de la familia de la insulina en el desarrollo.

Palabras clave: Proinsulina.—Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I.— Embrión.—Células madre.—Neurogénesis.

INTRODUCTION

We celebrate this year, 2005, the 100th anniversary of the birth of Endocrinology as a discipline, marked by the introduction of the term «hormone» by Ernest Henry Starling. He proposed this name to designate *certain chemicals, elaborated by glands and*

transported to distant body parts through the bloodstream, modifying body functions (38). In the following decades, the study of hormones was thus parallel to the study of the so named endocrine glands, thinking that they were *fixed couples*. With the speed of biological discovery in the «omics» era (genomics, proteomics, metabolomics, etc.), however, very few concepts have the label of *dogma* for very long time.

Insulin, since it was discovered by Banting and Best in 1921 and extracted from the dog pancreas (2), started a medical and pharmaceutical revolution in the treatment of diabetics, and remained known as an exclusive pancreatic hormone of vertebrates for most of the 20th century. With the advance of molecular and cellular techniques in recent years, it has become evident that insulin and its precursor proinsulin are expressed prior to pancreatic development and in organisms without a pancreas. In essence, all multicellular organisms are thought to have ancestral or evolved protein(s) of the insulin family (6) whereas the yeast genome does not contain any similar protein (8). The protochordate Amphioxus contains a single proinsulin-like gene (7) and more recent acquisitions led to the appearance of insulin-like growth factor (IGF) I and II in fish, amphibians and birds (6). In humans, there is an extended insulin family of proteins including relaxin, placentin and Leydig insulin-like peptide (21). These peptides signal the cells binding to several types of membrane tyrosine kinase receptors, from the ancestral single insulin receptor found in Amphioxus (30), to the mammalian diversified forms. These include the two forms of insulin receptor, containing or skiping exon 11 (4), the IGF-I receptor (15) and the hybrid receptors generated by them (17,29). Autophosphorylation of tyrosine residues in the ß-subunit of these receptors leads to phosphorylation in insulin receptor substrates (IRS) 1 to 4 and other transduction molecules (26,34), activating two major intracellular pathways: the PI3-kinase/Akt and the Ras/MAPK pathways (5,24). These signalling cascades and networks of activated molecules influence multiple cellular processes, including proliferation, cell growth, differentiation, migration, metabolism, and overall life span (16,20,33).

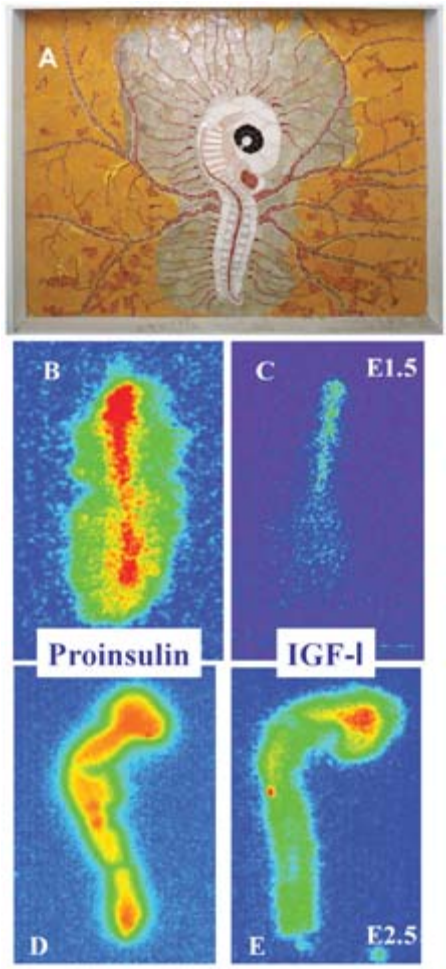


FIGURE 1. *A) Mosaic representing a chick embryo of approximately 3 days of development (E3) (Photography courtesy of Prof. Nicole Le Douarin. Institut d'Embriologie Cellulaire et Moléculaire, Nogent-sur-Marne, France). B) and D) In situ hybridization to demonstrate proinsulin mRNA distribution in the E1.5 and E2.5 chick embryo respectively. The image is processed in pseudocolor, red indicates high signal. C) and E) In situ hybridization for IGF-I mRNA at the indicated days of development (25).*

Expression of proinsulin and IGFs in chick embryo gastrulation and neurulation

The chick embryo has been a classic vertebrate model to analyze development from gastrulation, when the three embryo layers are defined, to neurulation and early organogenesis. It is accessible and indeed a beautiful artistic inspiration (Fig. 1A). Despite the lack of a pancreatic rudiment morphologically until the third day of incubation (E3), we found immunoreactive proinsulin/insulin in extracts of E2 embryos by radioimmunoassay (11). The possibility of quantifying the low amounts, as compared to pancreas, of embryonic proinsulin mRNA was possible only by using large amounts of Poly-A^+ RNA, but confirmed the presence of transcripts in E2 chick embryos (36). Surprisingly, even though IGF-I had been recognized as a broadly expressed tissue growth factor, IGF-I mRNA was minimally expressed prior to E3 in chick embryos, even when analyzed by the highly sensitive technique of reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR) (37). Indeed, we could confirm both by RT-PCR (31) and by in situ hybridization (Fig. 1) that during neurulation proinsulin mRNA was broadly expressed along the embryo whereas IGF-I was barely detectable (Fig. 1B, C) (25). In early organogenesis, in E2.5 embryos, the expression of proinsulin mRNA was more restricted, but still significant in developing brain, and the two pancreatic buds (which will later be fused) were also positive (Fig. 1D). IGF-I initial expression was mostly localized in cephalic vesicles in E2.5 (Fig. 1E).

We were interested in defining if the protein produced by this proinsulin transcript was unprocessed proinsulin or mature insulin and for that purpose we developed an antiserum against the connective C-peptide that is cleaved during processing of proinsulin by the specific convertases. Immunofluorescence performed with this antiserum confirmed the presence of proinsulin in distinct cells of the three embryonic layers by E1. A few neuroepithelial cells were the most clearly labelled (Fig. 2B). This was in contrast with the absence of IGF-I in parallel sections (Fig. 2C), which agreed with the previous RNA data. IGF-II was found in extracellular, likely basal membrane, locations (Fig. 2D). With further development, in E2.5, at mid embryo level, multiple structures expressed proinsulin,

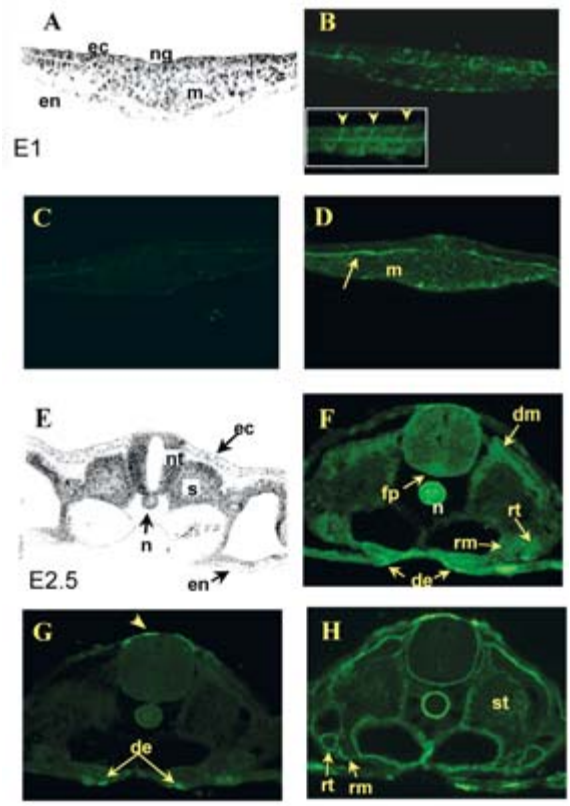


FIGURE 2. *Distribution of factors by immunofluorescence in chick embryos. A-D) E1 embryos (stage 6), E-H) E2.5 embryos (stage 15). Transversal criosections at mid-level in A, and caudal to the viteline artery in E (microscopy taken from Bellairs and Osmond, The Atlas of Chick Development. 1998. San Diego, California, Academic Press). Proinsulin is detected with an antipeptide-C antiserum (Rb40) in B (inset shows a detail with labelled neuroectodermic cells in the lateral zone, arrowheads) and F (positive areas include the floor plate of the neural tube, notochord and dermamyotome of somite). IGF-I immunostain is negative in C and labelled only a few ectodermic (short arrow) and digestive endodermic cells (long arrows) in G. IGF-II immunostain labelled basal membranes in D (arrow) and H (note around notochord and neural tube). Fluorochorome was Cy2 and images were captured with a CCD camera. ec, ectoderm; m, mesoderm; en, endoderm; n, notochord; ng, neural groove; nt, neural tube; s, somite; fp, floor plate; dm, dermomyotome; st, sclerotome; de, digestive endoderm; rm, renal mesenchyme; rt, renal tubule.*

including the floor plate of the neural tube, notochord, dermomyotome of the somite, and cells in the rudiment of the renal tubule and

digestive endoderm (Fig. 2F). IGF-I protein was detected in a few ectoderm cells in the dorsal part of the neural tube and a few cells in the digestive endoderm (Fig. 2G). IGF-II was more broadly present, decorating multiple basal membranes (Fig. 2H).

Overall, members of the insulin family are therefore present at very early stages of vertebrate development, and the prohormone proinsulin, previously believed to be nearly inactive, was expressed in a tissue- and time-specific manner in the chick embryo. We had proposed that there was an *endocrinization* of the early embryo (14), but these hormone-like factors were there before circulation was established, thus acting in more of a short-range, *paracrine* or *autocrine* manner, rather than in the canonical endocrine, longe-range form.

Embryonic proinsulin transcripts: more surprises

The multiple studies performed on pancreatic insulin regulation aimed at understanding the physiopathology of diabetes and approaches for therapy had demonstrated that glucose was the major stimulus for proinsulin gene expression and insulin secretion (41). Our studies with cultured prepancreatic chick embryos showed that proinsulin mRNA at that stage was not regulated by glucose (31). The analysis of the embryonic transcript provided further surprises, since at least two different embryonic mRNAs were identified, distinct from pancreatic proinsulin mRNA.

The chick embryo contains a single proinsulin gene, as in the human, and in contrast to the mouse, in which the proinsulin gene has been duplicated (see later). The protein coding region is contained in exon 2 and exon 3, whereas exon 1 is untranslated (5'UTR). The product obtained by rapid amplification of the cDNA end (5'RACE) was different in the pancreas than in the E1.5 chick embryo (Fig. 3).

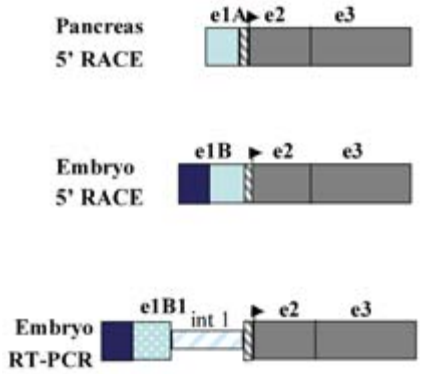


FIGURE 3. *Schematic representation of different embryonic and pancreatic proinsulin mRNA transcripts. Exons (e) and intron 1 (int) are represented. The arrow above indicates the translation initiation site. The techniques used were 5'RACE and RT-PCR with total RNA from pancreas and E1.5 chick embryos.*

Exon 1 of the embryo had an extension of 32 nucleotides with respect to exon 1 of the pancreas (19) yielding two mRNAs that we termed Pro1B and Pro1A, respectively. The protein product in both cases was proinsulin. Translation of the embryonic form is markedly downregulated by the presence of two upstream AUGs within the 32 nucleotide extension of the Pro1B mRNA (19). A later approach using PCR confirmed the expression from gastrulation to organogenesis of the Pro1B transcript, and revealed another alternative proinsulin transcript, a form that retained intron 1 (717 nucleotides) (28) (Fig. 3). Termed Pro1B1, it is a mature cytoplasmic mRNA but its translational capacity is nearly blocked due to its long leader region. There was differential developmental regulation of this new mRNA, with increasing abundance from gastrulation to neurulation and organogenesis.

We wonder whether this highly sophisticated regulation of proinsulin expression had any possible physiological implication and tried to look at events in early development that may be modulated by insulin or proinsulin.

Abnormal levels of proinsulin/insulin signalling cause changes in programmed cell death

Since classic binding-competition and autoradiography studies had revealed that the chick embryo had insulin receptors and IGF-I receptors from the stage of gastrulation onwards (1,18), we suspected that the proteins of the family had previously unknown roles in early development. We focused our attention on the process of programmed cell death, generally occurring as apoptosis, which is relevant to multiple morphogenetic events in development (43) including the closure of the neural tube (Fig. 4A). Using the technique of Terminal Deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP Nick End Labelling (TUNEL), we could quantify the number of cells of a chick embryo during neurulation that undergo apoptosis, in vivo and in culture (Fig. 4B, C). When the embryonic endogenous proinsulin signal was interfered by using antisense oligonucleotides against proinsulin mRNA (25) or the insulin receptor mRNA (19), there was an increase in the number of cells dying of apoptosis (Fig. 4). Preventing cell death, thus, appeared as an important function of embryonic proinsulin. The modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by proinsulin/insulin was found to correlate with the prevention of apoptosis (10).

We had known for some years that correct proinsulin/insulin signalling was needed to continue normal development beyond neurulation since insulin or insulin receptor antibodies caused a certain level of malformed or dead embryos between E2 and E4 of development (12). Opposite pharmacological experiments involving the addition of excess insulin or proinsulin also caused abnormalities and death (13).

In a similar way, it was found critical during neurulation to maintain the proinsulin signal within physiological limits. An excess of exogenously added proinsulin caused abnormalities that affected the neuropore, neural tube, and optic vesicles in the neurulating embryo (Table I), concomitant with a decrease in natural apoptosis (42). A tightly regulated proinsulin gene expression, therefore, is required to maintain the level of cell survival/cell death also strictly regulated in the embryo. This suggests an early important role for a protein prohormone previously thought to have little activity.

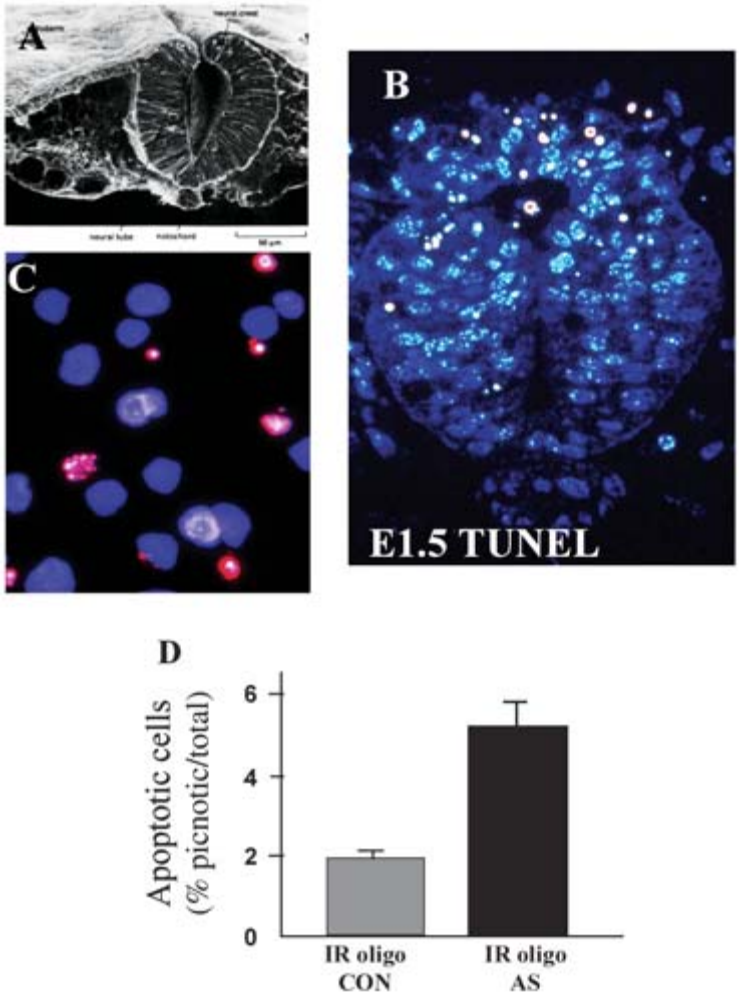


FIGURE 4. *Apoptotic cell death in the chick embryo dorsal neural tube. A) Cross-section of the neural tube by scanning electron microscopy of a E1.5 embryo. B) TUNEL assay detecting apoptotic cells, predominant in the dorsal part (upper) of the neural tube. C) Dissociated cells from the embryo stained by TUNEL (note bright apoptotic bodies). D) Mean values of percent of apoptotic cells in E1.5 embryos treated with antisense oligonucleotides against the insulin receptor (IR oligo AS) or a control (IR oligo CON).*

TABLE I. *Developmental abnormalities induced by proinsulin excess in E1,5 chick embryos*

	Nº of embryos
Control embryos abnormal	0 /13
Proinsulin treated embryos abnormal	12/15
Abnormalities:	
Asymmetric anterior neuropore closure	5/15
Flattened optic vesicles	8/15
Asymmetric rhombomers	6/15
Neural tube flexures	9/15
Reduction of apoptosis in proinsulin treated embryos:	5/5

From Hernández-Sánchez et al. 2003

IGF-I is essential for differentiation of neural stem/precursor cells in mice

After the progress made in understanding an early developmental role of proinsulin, it did not escape our attention that most investigators in the field of growth and development had analysed the possible roles of two other proteins of the family, IGF-I and II, in much more depth. Experiments using gene targeting deletion approaches generated mice lacking expression of IGF-I and II, and their receptors, alone or in combination, over a decade ago. Together with the confirmation of the essential role of each of these two factors in prenatal growth -in addition to IGF-I's role in postnatal growth, which has led to its use in human therapy (35) emerged evidence of a variety of subtle phenotypes in different tissues (3, 23, 27). From our previous studies in chick embryos we knew that IGF-I was expressed earlier during organogenesis in the nervous system than in other tissues; the availability of IGF-I knockout mice convinced us to switch to this model for a detailed analysis of the role of IGF-I in neurogenesis.

To set out a suitable system for manipulation we established highly proliferative cultures with the self-renewal characteristics of stem cells (39), obtained from the olfactory bulb of embryonic E12.5

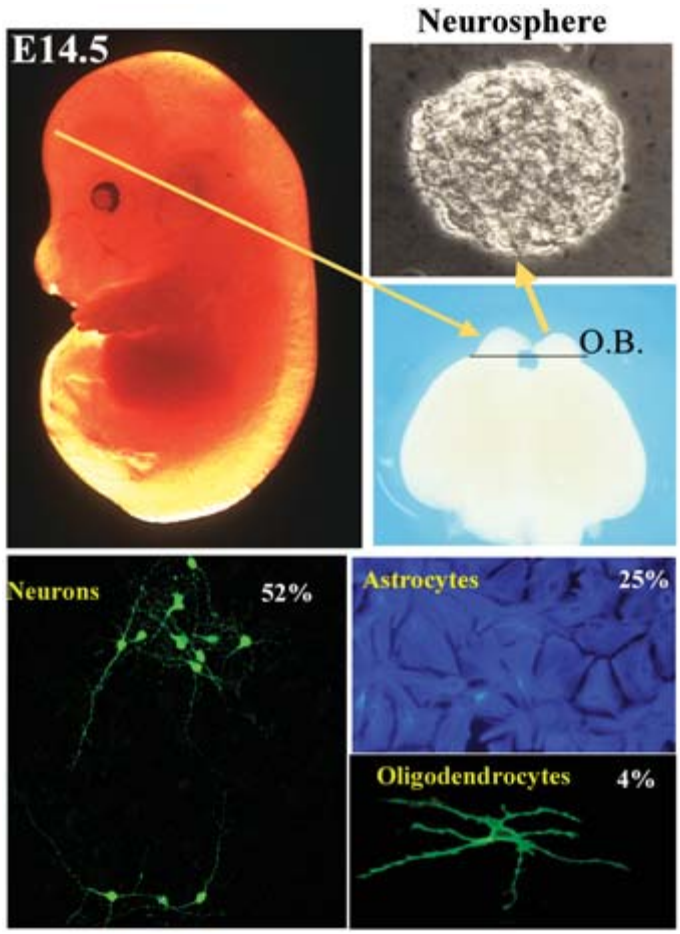


FIGURE 5. *Isolation of neural stem cells from E15 mouse olfactory bulb (O.B.). Mouse embryo O.B. are dissected from brain (line over the dorsal view indicates the section plane) and dissociated cells are placed in culture in the presence of FGF-2 and EGF plus insulin or IGF-I. The cells divide actively and after 3-4 days they form round aggregates, denominated neurospheres. After multiple passages the cells maintain their proliferative nature. When the mitogens are withdrawn (in the presence of insulin or IGF-I) and cells are plated at high density, they enter a differentiation program and, after 3-5 days, cells with the characteristics of neurons (TUJ1$^+$), astrocytes (GFAP$^+$) and oligodendrocytes (O4$^+$) can be identified in the culture. The percentages indicated are the average values obtained in a typical culture (40).*

to E14.5 mice (40) (Fig. 5). These cells, growing as neurospheres, were stimulated to proliferate by exogenous IGF-I in a dose-

dependent manner. Interestingly, insulin or proinsulin had no effect on proliferation, and only a small cell survival effect if added alone, but they were synergistic with EGF and FGF2 when added together with these two mitogens. When high insulin or low IGF-I was present and the mitogens were withdrawn, the stem cells stopped proliferating and underwent differentiation into the three types of cells characteristic of the central nervous system: neurons, astrocytes and oligodendrocytes (Fig. 5). Compared to other types of embryo-derived neural stem cells reported in the literature, the isolated olfactory bulb stem/precursor cells showed a remarkable capacity to generate neurons (52% of the differentiated cells after 3-4 days) (Fig. 5).

If instead of preparing neurospheres from olfactory bulbs of wild type mice, we used IGF-I knockout mice, the cells were able to proliferate in culture normally, whereas their ability to differentiate into neurons and glia were impaired (40). This finding agreed with in vivo data, since olfactory bulb mitral neurons were decreased in the IGF-I knockout embryos at E18.5 (32).

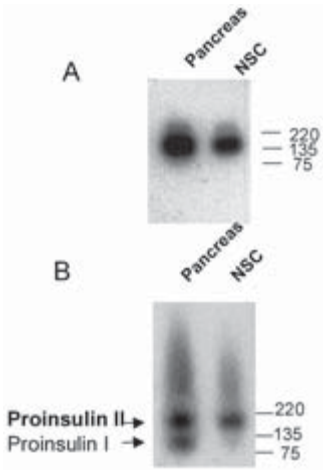


FIGURE 6. *Expression of proinsulin II mRNA in the O.B. stem cells. A) RT-PCR of a common region of proinsulin mRNA I and II followed by Southern blot with a nested oligonucleotide in pancreas and proliferative neural stem cells (NSC). B) Restriction enzyme digestion with MspI of the PCR products generated in A, followed by Southern blot shows the presence of proinsulin II in NSC.*

The fact that the cells from mice lacking IGF-I managed to maintain normal proliferation in culture suggested that perhaps they were overproducing other proteins of the insulin family or they were upregulating the IGF-I receptor to compensate. We set out RT-PCR analysis of the proinsulin I and proinsulin II mRNAs from wild type mice in a way that we could determine if one or both of the genes were expressed. In the mouse pancreas, the two mRNAs are co-expressed, whereas in the proliferating neural stem cells, only proinsulin II mRNA was found (Fig. 6). Additional experiments compared the wild type neural stem cells with those from IGF-I knockout mice and the results were variable (Fig. 7). We would need to analyze a larger number of mice to be certain that there was overcompensation at the level of proinsulin II expression in the absence of IGF-I. Even with similar amounts of proinsulin mRNA, however, different transcripts with distinct translational capacity might be present, an aspect that remains to be elucidated. More

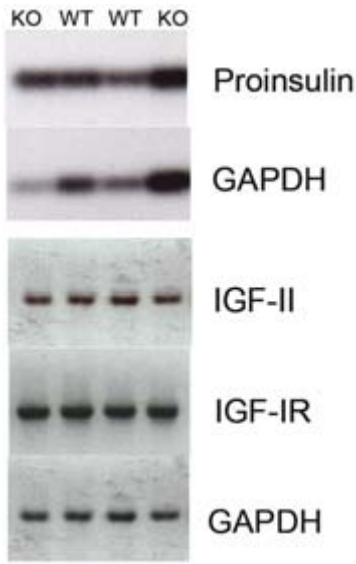


FIGURE 7. *Expression of proinsulin, IGF-II and IGF-I receptor in O.B. stem cells from wild type (WT) and IGF-I knockout mice (KO). RNA from the proliferative O.B. stem cells derived from normal mice or mice null for IGF-I was subjected to RT-PCR followed by Southern blot for the indicated genes, proinsulin, IGF-II, the IGF-I receptor and the control GAPDH (corresponding in each case to the sample(s) above.*

consistent results were observed with IGF-II and the IGF-I receptor mRNAs, neither of which appeared to change in proliferating neural stem cells under proliferative conditions, whether or not they had the IGF-I gene knockout (Fig. 7). Nevertheless, this finding does not exclude the possibility that IGF-II or the IGF-I receptor could be up-regulated at the posttranscriptional level.

In neurogenesis, therefore, the presence of proinsulin as well as IGF-I and II mRNAs suggests that all three proteins may play a role but the most clear effect observed, thus far, is the essential action of IGF-I in neural differentiation, at least in the mouse olfactory bulb.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jose Serna for contributing the immunofluorescence images in Fig. 2, Dr. Alicia Mansilla for critical reading of the manuscript and past and present members of the laboratory for their continuing efforts. Studies in the laboratory are funded by the Spanish Ministry of Education and Science, Comunidad de Madrid and Red de Grupos RGDM G03/212 from the Instituto de Salud Carlos III (Spain). The Ramón y Cajal contract to C.H-S. was awarded by the MEC. This review is a modified version of the conference presented by F. de Pablo on November 4, 2004 with the occasion of becoming *Académica Correspondiente* of the Academy.

REFERENCES

(1) BASSAS, L.; DE PABLO, F.; LESNIAK, M. A. and ROTH, J. (1985) Ontogeny of receptors for insulin-like peptides in chick embryo tissues: early dominance of insulin-like growth factor over insulin receptors in brain. *Endocrinology* 117: 2321-2329.

(2) BANTING, F. G. and BEST, C. H. (1922): *J. Lab Clin. Med.* 7: 256-271.

(3) BAKER, J.; LIU, J. P.; ROBERTSON, E. J. and EFSTRATIADIS, A. (1993): Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 75: 73-82.

(4) BENECKE, H.; FLIER, J. S. and MOLLER, D. E. (1992): Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues. *J. Clin. Invest* 89: 2066-2070.

(5) BEVAN, P. (2001): Insulin signalling. *J. Cell Sci.* 114: 1429-1430.

(6) CHAN, S. J. and STEINER, D. F. (2000): *Amer. Zool.* 40: 213-222.
(7) CHAN, S. J.; CAO, Q. P. and STEINER, D. F. (1990): Evolution of the insulin superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 9319-9323.
(8) CHERVITZ, S. A. and cols. (1998): Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* 282: 2022-2028.
(9) DE LA ROSA, E. J.; BONDY, C. A.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. ; WU, X. ; ZHOU, J.; LÓPEZ-CARRANZA, A.; SCAVO, L.M. and DE PABLO, F. (1994): Insulin and insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *Eur. J. Neurosci.* 6: 1801-1810.
(10) DE LA ROSA, E. J.; VEGA-NÚÑEZ, E.; MORALES, A. V.; SERNA, J.; RUBIO, E. and DE PABLO, F. (1998): Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 9950-9955.
(11) DE PABLO, F.; ROTH, J.; HERNÁNDEZ, E. and PRUSS, R. M. (1982): Insulin is present in chicken eggs and early chick embryos. *Endocrinology* 111: 1909-1916.
(12) DE PABLO, F.; GIRBAU, M.; GÓMEZ, J. A.; HERNÁNDEZ, E. and ROTH, J. (1985a): Insulin antibodies retard and insulin accelerates growth and differentiation in early embryos. *Diabetes* 34: 1063-1067.
(13) DE PABLO, F.; HERNÁNDEZ, E.; COLLIA, F. and GÓMEZ, J. A. (1985b): Untoward effects of pharmacological doses of insulin in early chick embryos: through which receptor are they mediated? *Diabetologia* 28: 308-313.
(14) DE PABLO, F. and ROTH, J. (1990): Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem. Sci.* 15: 339-342.
(15) DUPONT, J. and LE ROITH, D. (2001): *Horm. Res.* 55 Suppl 2: 22-6, 22-26.
(16) FISHER, T. and WHITE, M. (2004): Signaling pathways: the benefits of good communication. *Curr. Biol.* 14: 1005-1007.
(17) GARCÍA DE LACOBA, M.; ALARCÓN, C., DE LA ROSA, E. J. and DE PABLO, F. (1999): Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology* 140: 233-243.
(18) GIRBAU, M.; BASSAS, L.; ALEMANY, J. and DE PABLO, F. (1989): *In situ* autoradiography and ligand-dependent tyrosine kinase activity reveal insulin receptors and insulin-like growth factor I receptors in prepancreatic chicken embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 5868-5872.
(19) HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; RUBIO, E.; SERNA, J.; DE LA ROSA, E. J. and DE PABLO, F. (2002): Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes* 51: 770-777.
(20) JONES, J. I. and CLEMMONS, D. R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16: 3-34.
(21) KASIK, J. W.; LU, C. and MENON, R. K. (2000): The expanding insulin family: structural, genomic, and functional considerations. *Pediatr Diabetes* 1: 169-177.

(22) KIMURA, K. D.; TISSENBAUM, H. A.; LIU, Y. and RUVKING, G. (1997): daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans. *Science* 277: 942-946.
(23) KITAMURA, T.; KAHN, C. R. and ACCILI, D. (2003): Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol*. 65: 313-32.
(24) LAWLOR, M. A. and ALESSI, D. R. (2001): PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* 114: 2903-2910.
(25) MORALES, A. V.; SERNA, J.; ALARCÓN, C.; DE LA ROSA, E. J. and DE PABLO, F. (1997): Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology* 138: 3967-3975.
(26) LIN, X.; TAGUCHI, A., PARK, S., KUSHNER, J. A., LI, F., LI, Y. and WHITE, M. F. (2004): Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* 114: 908-916.
(27) LIU, J. P., BAKER, J.; PERKINS, A. S.; ROBERTSON, E. J. and EFSTRATIADIS, A. (1993): Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59-72.
(28) MANSILLA, A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, C.; DE LA ROSA, E. J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, V.; MARTÍNEZ-SALAS, E.; DE PABLO, F. and HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. (2005): *EMBO Reports* 6: 1182-1187.
(29) PANDINI, G.; FRASCA, F.; MINEO, R.; SCIACCA, L.; VIGNERI, R. and BELFIORE, A. (2002): Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J. Biol. Chem.* 277: 39684-39695.
(30) PASHMFOROUSH, M.; CHAN, S. J. and STEINER, D. F. (1996): Structure and expression of the insulin-like peptide receptor from amphioxus. *Mol. Endocrinol.* 10: 857-866.
(31) PÉREZ-VILLAMIL, B.; DE LA ROSA, E. J.; MORALES, A. V. and DE PABLO, F. (1994): Developmentally regulated expression of the preproinsulin gene in the chicken embryo during gastrulation and neurulation. *Endocrinology* 135: 2342-2350.
(32) PICHEL, J. G.; FERNÁNDEZ-MORENO, C.; VICARIO-ABEJÓN, C.; TESTILLANO, P. S.; PATTERSON, P. H. and DE PABLO, F. (2003): Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF-1. *Mech Develop.* 120: 349-361.
(33) POTTER, C. J.; HUANG, H. and XU, T. (2001): Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 105: 357-368.
(34) SALTIEL, A. R. and KAHN, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
(35) SAVAGE, M. O.; BLAIR, J. C.; JORGE, A. J.; STREET, M. E.; RANKE, M. B. and CAMACHO-HUBNER, C. (2005): IGFs and IGFBPs in GH insensitivity. *Endocr Dev.* 9: 100-106.
(36) SERRANO, J.; BEVINS, C. L.; YOUNG, S. W. and DE PABLO, F. (1989): Insulin gene expression in chicken ontogeny: pancreatic, extrapancreatic, and prepancreatic. *Dev. Biol.* 132: 410-418.

(37) SERRANO, J.; SHUDINER, A. R.; ROBERTS, C. T.; LEROITH, D. and DE PABLO, F. (1990): The insulin-like growth factor I (IGF-I) gene is expressed in chick embryos during early organogenesis. *Endocrinology* 127: 1547-1549.
(38) STARLING, E. H. (1905): *The Lancet* 2: 339-341.
(39) VICARIO-ABEJÓN, C.; COLLIN, C.; TSOULFAS, P. and MCKAY, R. D. G. (2000): Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur. J. Neurosci* 12: 667-688.
(40) VICARIO-ABEJÓN, C.; YUSTA-BOYO, M. J.; FERNÁNDEZ-MORENO, C. and DE PABLO, F. (2003): Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J. Neurosci.* 23: 895-906.
(41) WICKSTEED, B.; ALARCÓN, C.; BRIAUD, I.; LINGOHR, M. K. and RHODES, C. J. (2003): Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. *J. Biol Chem.* 278: 42080-90.
(42) HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; MANSILLA, A.; DE LA ROSA, E. J.; POLLERBERG, G. E.; MARTÍNEZ-SALAS, E.; DE PABLO, F. (2003): Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *EMBO J.* 22 (20): 5582-92.
(43) DE LA ROSA E. J., DE PABLO F. (2000)**:** Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* 23 (10): 454-8. Review.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 783-798

Revisión

Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad

GUSTAVO BARJA
Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Desde los inicios del siglo XX se han propuesto muchas teorías diferentes sobre las causas del envejecimiento. Hoy en día, la teoría de los radicales libres de origen mitocondrial es la que disfruta de más apoyos a su favor en la literatura científica. En el presente artículo se revisan los trabajos publicados sobre la relación entre la longevidad máxima de las distintas especies animales y sus niveles endógenos de antioxidantes y de generación mitocondrial de radicales de oxígeno. La mayoría de los estudios sobre suplementación experimental con antioxidantes indican que pueden aumentar la esperanza de vida pero no cambian la longevidad máxima. Además, los antioxidantes endógenos correlacionan de forma negativa con la longevidad máxima. Sin embargo, la intensidad de producción mitocondrial de radicales de oxígeno y el daño oxidativo al ADN mitocondrial son menores en los animales longevos que en los de vida corta. Los animales longevos también muestran un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas tisulares que las especies de vida corta. Por otra parte, la restricción calórica, la manipulación experimental mejor conocida que disminuye la velocidad del envejecimiento, también disminuye la producción mitocondrial de radicales libres y el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Este descenso ocurre en el complejo I. Estos resultados sugieren que se han utilizado mecanismos similares para aumentar la longevidad tanto en la restricción calórica como durante la evolución de especies animales con distinta velocidad de envejecimiento, y que dichos mecanismos incluyen un descenso en la intensidad de generación de radicales libres en la mitocondria.

Palabras clave: Radicales libres.—Mitocondrias.—Envejecimiento.—Longevidad.—ADN.—Ácidos grasos.—Restricción calórica.

ABSTRACT

Mitochondrial free radicals and longevity

Since the beginning of the XXth century many theories have been proposed to explain aging. Nowadays, the mitochondrial free radical theory is strongly supported by the available scientific evidence. In this article published studies on the relationship between the maximum longevity of animals and their levels of endogenous antioxidants and mitochondrial rates of oxygen radical generation are reviewed. Most studies of antioxidant supplementation indicate that these chemicals can increase mean but not maximum longevity. In addition, endogenous antioxidant levels negatively correlate with maximum longevity. However, the rate of production of oxygen radicals at mitochondria and the steady-state levels of oxidative damage in mitochondrial DNA are lower in long-lived than in short-lived animal species. Long-lived species also have lower levels of fatty acid unsaturation in their cellular membranes. On the other hand, caloric restriction, the best know manipulation that decreases the rate of aging, also lowers mitochondrial free radical production and oxidative damage to mitochondrial DNA. This decrease occurs at complex I. These results suggest that common mechanisms have been used to increase longevity in caloric restriction and during the evolution of animal species with different aging rates. These mechanisms include a decrease in the rate of generation of free radicals at mitochondria.

Key words: Free radicals.—mitochondria.—aging.—longevity.—DNA.—fatty acids.—caloric restriction.

INTRODUCCIÓN

Durante la respiración celular se producen continuamente especies reactivas derivadas del oxígeno como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo (reactive oxygen species, ROS). Estas substancias atacan continuamente a todos los tipos de macromoléculas biológicas. Aunque la producción de ROS puede aumentar mucho en varias situaciones patológicas, en el individuo sano hay una producción celular baja pero continua de ROS. La mayor parte de dicha producción procede de la cadena respiratoria mitocondrial. La idea de que los radicales libres de origen mitocondrial son una de las principales causas del envejecimiento (1) tiene cada vez más apoyos en la literatura científica (2, 3). Cualquier teoría del envejecimiento debe ser capaz de explicar tres de sus características principales: es progresivo, universal y endógeno. El ca-

rácter progresivo del envejecimiento significa que ocurre a lo largo de toda la vida del individuo, tanto joven como viejo, con una intensidad más o menos constante. Además, todos los individuos envejecen, y lo mismo puede decirse de prácticamente todas las especies animales multicelulares, especialmente de aquellas que, como la humana, dejan de crecer al alcanzar el desarrollo adulto. Por último, el origen del envejecimiento es interno, lo que explica que el envejecimiento continúe aunque se proteja al individuo de toda fuente de daño procedente del medio ambiente. Este carácter endógeno también explica porqué las distintas especies animales envejecen a velocidades enormemente diferentes aunque vivan en el mismo ambiente. Los factores externos no pueden ser causa del proceso intrínseco del envejecimiento. Esto significa que la velocidad del envejecimiento de cada especie animal, y por tanto su longevidad máxima, está determinada fundamentalmente por sus genes, no por el medio ambiente. La teoría del envejecimiento por radicales libres de origen mitocondrial encaja con esas tres características del envejecimiento, ya que las mitocondrias son una fuente endógena de radicales libres, y todas las células de los órganos vitales producen ROS de forma continua en sus mitocondrias.

ANTIOXIDANTES Y LONGEVIDAD

Ante una producción continua de radicales libres, se necesitan mecanismos que minimicen el daño oxidativo. La producción de radicales libres en las células está contrarrestada, aunque solo parcialmente, por los antioxidantes endógenos celulares, para producir un equilibrio en el estrés oxidativo compatible con la viabilidad celular. La mayoría de los estudios sobre longevidad animal realizados inicialmente se centraron en los factores antioxidantes mas que en los prooxidantes, ya que los primeros eran mucho más fáciles de medir. Una de las primeras hipótesis que se plantearon fue que el envejecimiento podría deberse a un descenso en los niveles de antioxidantes conforme el individuo envejece. Está idea se descartó en cuanto se observó que las variaciones en las concentraciones de antioxidantes celulares en función de la edad no seguían un patrón uniforme, ya que disminuían, aumentaban, o no variaban en los animales viejos dependiendo del antioxidante medido, el órgano

estudiado, o la especie o cepa animal elegida (4). Otros autores propusieron sin embargo, basándose en algunos estudios comparados iniciales, que los antioxidantes eran factores determinantes de la longevidad (5). Esto se basaba en la observación de que algunos antioxidantes como la actividad de la CuZnSOD (superóxido dismutasa) correlacionaban positivamente con la longevidad máxima de los mamíferos, aunque esto sólo ocurría después de dividir dicha actividad por la tasa metabólica del animal (5). Puesto que los animales comparados por estos autores tenían tamaños corporales muy diferentes, y los animales grandes tienen tasas metabólicas específicas menores que los pequeños, las correlaciones positivas observadas con la longevidad máxima se debían al menor consumo de oxígeno por unidad de masa de los animales longevos, no a que tuviesen mas CuZnSOD. De hecho, el trabajo original mostraba la ausencia de correlación entre la CuZnSOD y la longevidad máxima (5). Cuando los niveles de los distintos tipos de antioxidantes tisulares se relacionaron con la longevidad máxima sin realizar ningún tipo de transformación matemática, de los doce trabajos publicados realizados en siete laboratorios diferentes diez mostraron que las enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular correlacionan de forma negativa con la longevidad máxima (6), mientras que en los otros dos trabajos no se observó correlación (5, 7). Estas correlaciones negativas constituyen el indicio principal de que la intensidad de generación de radicales libres en los tejidos *in vivo* tiene que ser menor en las especies longevas que en las que muestran una mayor velocidad de envejecimiento.

Es importante también considerar los estudios experimentales acerca de los efectos sobre la longevidad de la manipulación de los antioxidantes tisulares a lo largo de todo el ciclo vital de los animales. De un total de dieciséis estudios de este tipo, realizados mediante suplementación de antioxidantes en la dieta, inducción farmacológica, o con técnicas transgénicas, en cuatro estudios aumentó ligeramente la longevidad máxima, mientras que en los doce restantes dicha longevidad no se modificó (3). Esta tendencia general a una ausencia de efecto de los antioxidantes sobre la velocidad del envejecimiento es más evidente en los vertebrados, en los que de un total de ocho estudios, sólo uno describió un aumento de un 12% en la longevidad máxima de los ratones, mientras que en los otros

siete trabajos no se encontraron efectos en ranas, ratones o ratas. De acuerdo con esto, se ha observado que la sobreexpresión de la CuZnSOD en un 50-300% en varios tejidos de ratones transgénicos da lugar a un fenotipo patológico en muchos órganos vitales con una longevidad máxima igual o incluso más corta que la de los controles y una mayor resistencia al estrés (8). En otro estudio la sobreexpresión de la CuZn SOD 4-13 veces por encima de lo normal en el ratón generó un amplio abanico de cambios neurodegenerativos incluyendo el hinchamiento y vacuolización de las mitocondrias neuronales, degeneración axónica y pérdida de motoneuronas espinales durante el envejecimiento (9). También se ha descrito en *Drosophila melanogaster* que la sobreexpresión de la glutation reductasa aumenta la resistencia al estrés sin cambiar la longevidad máxima (10), mientras que en los ratones la sobreexpresión de la MnSOD aumenta la resistencia a la hiperoxia (11), pero la sobreexpresión de la CuZn SOD en el ratón no afecta a la longevidad (12). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la longevidad máxima, en los estudios arriba citados sí se encontró frecuentemente que la esperanza media de vida sube en los animales con niveles de antioxidantes tisulares aumentados. Esto sugiere que los antioxidantes pueden proteger de forma inespecífica contra muchas causas de muerte prematura, es decir que pueden aumentar la probabilidad de supervivencia, especialmente cuando los experimentos se realizan en condiciones subóptimas. Esto se debe, al menos en parte, a la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con inducciones protectoras frente a los aumentos de estrés oxidativo de origen exógeno. Estos efectos protectores podrían tener gran importancia para evitar la muerte prematura en el hombre, especialmente en el caso de poblaciones que viven en condiciones ambientales subóptimas que dan lugar a curvas de supervivencia poco rectangulares. Sin embargo, la ausencia general de efecto de los antioxidantes sobre la longevidad máxima indica que no son capaces de disminuir la velocidad del envejecimiento.

También están de acuerdo con este concepto muchos experimentos realizados en animales knockout para genes que codifican enzimas antioxidantes. Así, la velocidad del envejecimiento no cambia en ratones homocigotos knockout para la CuZnSOD (13), la SOD extracelular (14), o la glutation peroxidasa (15), o heterocigotos knockout

para la MnSOD (16). En estos casos, los efectos se limitan a una ausencia de efecto o a una sensibilidad mayor que la normal al estrés. En el caso de ratones homocigotos knockout para la MnSOD, la ausencia de la enzima produce un fenotipo fuertemente patológico, que da lugar a una cardiomiopatía dilatada y a la muerte a los pocos días de vida (17), y que es completamente distinto del proceso del envejecimiento. En resumen, todos los tipos de estudios realizados indican que los antioxidantes pueden incrementar la esperanza de vida en ciertas condiciones, pero no modifican la velocidad del envejecimiento ni la longevidad máxima.

GENERACIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES, ADN MITOCONDRIAL Y LONGEVIDAD MÁXIMA

Puesto que los antioxidantes no modifican la velocidad del envejecimiento, ¿cuáles son entonces los factores que establecen la conexión entre el estrés oxidativo y el envejecimiento? Los estudios disponibles apuntan ya a dos parámetros como responsables de dicha relación. El primer parámetro descubierto que correlaciona con la velocidad del envejecimiento en el sentido apropiado es la intensidad de generación mitocondrial de ROS. Todos los estudios realizados hasta la fecha han encontrado que la producción de ROS de las mitocondrias aisladas de tejidos post-mitóticos es menor en las especies animales longevas que en las de vida corta (3, 18, 19; Fig. 1). Esto es cierto en todo tipo de animales homeotermos longevos tanto si su tasa de consumo de oxígeno es lenta (como en los mamíferos de gran tamaño corporal), como si es rápida (como en las aves de pequeño tamaño). Esta observación clave puede explicar también porqué la correlación entre antioxidantes y longevidad máxima es negativa: los animales longevos tienen niveles bajos de antioxidantes simplemente porque su intensidad de producción de ROS por unidad de tiempo es pequeña.

Por otra parte, se ha encontrado que el daño oxidativo al ADN mitocondrial de corazón y cerebro, medido como 8-oxo-7,8-dihydro-2'deoxyguanosina (8-oxodG), correlaciona también negativamente con la longevidad máxima en los homeotermos (incluyendo a aves y mamíferos), mientras que esto no ocurre en el caso del ADN nu-

clear (20). Además, de acuerdo con datos preliminares de hígado de rata (21), estudios realizados en el corazón y el cerebro de once especies de mamíferos y aves ha demostrado que los niveles de daño oxidativo son varias veces mayores en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear (20) y pueden aumentar con la edad. Puesto que ahora se sabe que existen sistemas enzimáticos de reparación de la 8-oxodG no sólo en el núcleo, sino también en las mitocondrias, se ha sugerido que los aumentos en el daño oxidativo al ADN con la edad reflejan que el flujo de daño oxidativo (ataque y reparación) a través del ADN es mayor en los animales viejos que en los jóvenes (22). Análogamente, los resultados de las comparaciones entre especies también reflejan que dicho flujo es mayor en el ADN mitocondrial de los animales de ciclo vital corto que en el de los animales longevos, y lo mismo se puede decir del flujo de daño oxidativo a través del ADN mitocondrial comparado con el flujo a través del ADN nuclear en cada especie animal (20). Así pues, cuanto mayor es la longevidad máxima de una especie, menor es la intensidad de ataque oxidativo a su ADN mitocondrial (22). Sería esto relevante para el envejecimiento a pesar de la presencia de reparación de la 8-oxodG en las mitocondrias? Lo sería porque los ROS causan muchos tipos de daño en el ADN además de la formación de 8-oxodG, y varias de esas formas de daño no se reparan de forma eficiente y se acumulan con la edad. Así, la mayor producción mitocondrial de ROS de los animales de vida corta puede ser una causa importante de su velocidad mucho mayor de acumulación de mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial (Fig. 1). Dicha acumulación necesita 70-100 años para ocurrir en el hombre, pero se da en sólo dos-tres años en el ratón. Además, puesto que la presencia de 8-oxodG en el ADN es mutagénica (23), el nivel más alto de 8-oxodG de los animales de vida corta en relación a los longevos también contribuiría a su mayor tasa de acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial. Los mayores niveles de 8-oxodG del ADN mitocondrial en relación al nuclear pueden explicar también la mayor intensidad de acumulación de mutaciones somáticas del primero. El resultado final es probablemente un aumento del número de células postmitóticas con función anormal conforme aumenta la edad del individuo.

INSATURACIÓN DE LAS MEMBRANAS Y LONGEVIDAD

Además de la producción mitocondrial de ROS, se ha descubierto un segundo parámetro relacionado con el estrés oxidativo que también correlaciona con la longevidad máxima en el sentido adecuado: el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares de los órganos vitales. Estudios iniciales que no trataban sobre longevidad encontraron que el número total de dobles enlaces de los ácidos grasos (el índice de dobles enlaces) correlacionaba negativamente con el tamaño corporal en los mamíferos (24). Luego se observó que las aves, que son mucho más longevas que los mamíferos, también tienen un menor índice de dobles enlaces que los mamíferos de igual tamaño corporal y tasa metabólica (25). Los ácidos grasos insaturados son las macromoléculas más sensibles al daño inducido por los radicales libres que existen en las células, debido a la presencia de electrones muy inestables junto a sus dobles enlaces. Además, su sensibilidad a la peroxidación lipídica aumenta exponencialmente conforme sube el número de dobles enlaces por molécula. Por lo tanto, el bajo índice de dobles enlaces del corazón, el músculo esquelético, el riñón y el hígado de los animales longevos (26) protegería a sus tejidos frente a la peroxidación lipídica de forma constitutiva tanto si tienen tasas metabólica bajas (como los mamíferos de gran tamaño corporal) o altas (como las aves). Esto fue de hecho lo que se encontró cuando se estudió la intensidad de la peroxidación lipídica en estas especies (Fig. 1). La peroxidación lipídica no sólo es destructiva para los lípidos. Los productos de la peroxidación lipídica también pueden modificar covalentemente otros tipos de macromoléculas como las proteínas causando alteraciones en su estructura y función. De acuerdo con esto, se ha observado que los niveles de malondialdehido-lisina y carboximetil-lisina en proteínas mitocondriales cardiacas son menores en los mamíferos y aves longevos, que tienen también un bajo grado de insaturación de sus ácidos grasos, que en los que envejecen rápidamente (26). Este bajo grado de insaturación de los animales longevos no se debe a la dieta (un factor exógeno). Por el contrario, se trata de un parámetro regulado homeostáticamente a un nivel distinto en cada especie según cual sea su longevidad máxima (26). Por otra parte, los análisis detallados de la composición en ácidos grasos indican que la

causa principal del menor número de dobles enlaces de las especies longevas es la presencia de niveles bajos de actividad delta-5 y delta-6 desaturasa (26), que son limitantes para la biosintesis de ácidos grasos muy insaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (con cuatro doble enlaces por molécula) y el ácido docosahexaenoico (con seis dobles enlaces) a partir de sus precursores menos insaturados. Estos resultados no se limitan a modelos comparados sino que también responden a la modificación experimental. Se ha observado recientemente que al aumentar experimentalmente el grado de insaturación de las membranas celulares se produce un aumento del daño oxidativo no sólo a lípidos sino también a proteínas y al ADN mitocondrial en cerebro de rata (27).

RESTRICCIÓN CALÓRICA Y ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL

Los distintos niveles de producción mitocondrial de radicales libres y daño oxidativo al ADN mitocondrial en función de la longevidad de las distintas especies animales apoyan con fuerza la teoría del envejecimiento por radicales libres. Sin embargo las correlaciones, aunque coincidentes con las predicciones de la teoría, no implican necesariamente la existencia de relaciones causales entre los parámetros implicados. Por eso es interesante comprobar si dichos parámetros se modifican en el sentido adecuado cuando se altera experimentalmente la velocidad del envejecimiento. Tal alteración no es tarea fácil. Afortunadamente, existe una manipulación experimental que aumenta la longevidad máxima debido a una ralentización de la velocidad del envejecimiento: la restricción del número de calorías que el animal ingiere (28). El aumento de longevidad máxima inducido por la restricción calórica se ha demostrado innumerables veces en roedores de laboratorio, así como en otras especies incluyendo nematodos, rotíferos, insectos, arácnidos y peces, y actualmente se está estudiando si también ocurre en primates no humanos.

Muchos estudios recientes han investigado si el mecanismo de acción de la restricción calórica sobre la longevidad máxima incluye cambios en la producción mitocondrial de ROS y el daño sub-

siguiente al ADN mitocondrial (29). Estos estudios sobre la producción de ROS, que se han realizado tanto a corto como a largo plazo en el corazón de ratas jóvenes y viejas, aclaran si ocurren tales cambios, dónde ocurren dentro de la cadena respiratoria, y cual es el mecanismo que los genera (29). La restricción calórica a corto plazo (seis semanas) no cambió ninguno de los parámetros estudiados en el corazón. Sin embargo, la restricción calórica a largo plazo (un año) disminuyó casi a la mitad la producción mitocondrial de ROS (Fig. 1) e hizo descender también el daño oxidativo al ADN mitocondrial sin modificar dicho daño en el ADN nuclear en el corazón de ratas viejas (29). Se han encontrado también descensos en la generación mitocondrial de ROS tras la restricción calórica en el hígado a corto y largo plazo (30, 31) y el músculo esquelético a largo plazo (32) pero no en el riñón a corto plazo (33). Estudios recientes de otros autores han confirmado el descenso generalizado de producción mitocondrial de ROS en la restricción calórica en los tejidos de los mamíferos (34-36). Por otra parte, hemos observado que la restricción protéica sin restricción calórica intensa también hace descender la producción de ROS en el hígado a corto plazo (37). En cambio, la restricción calórica no cambia de forma coherente ni la actividad (38) ni la expresión génica (39) de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa o glutation peroxidasa. El descenso en el ataque por ROS y en los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial en la restricción calórica indica que el flujo del daño oxidativo (ataque y reparación) a través de éste ADN debe ser menor, como en el caso de los animales longevos respecto a los de vida corta, en los animales restringidos que en los alimentados *ad libitum* (22, 29). De hecho, se ha observado que la restricción calórica disminuye la expresión de varios genes que codifican para sistemas de reparación del ADN (40-42). Otro aspecto importante es que el efecto de la restricción calórica no consiste fundamentalmente, como se había sugerido inicialmente (38), en evitar un aumento de producción mitocondrial de ROS en el animal viejo, sino en disminuir dicha producción por debajo de los niveles basales de los animales, tanto jóvenes como viejos (29). Este tipo de cambio es el que cabría esperar si la restricción calórica disminuye la velocidad del envejecimiento a través de una reducción en la producción mitocondrial de ROS.

FIGURA 1. *Tanto las especies animales longevas como los mamíferos sometidos a restricción calórica comparten una característica común: tienen una producción lenta de ROS en sus mitocondrias. En relación con ello, el daño oxidativo al ADN mitocondrial (ADNmt) es menor, se acumulan más despacio las mutaciones somáticas en el ADN y la velocidad del envejecimiento es más lenta. Además de esto, las membranas celulares de las especies longevas tienen un grado menor de insaturación de sus ácidos grasos (menor DBI; DBI = índice de dobles enlaces), lo que las hace más resistentes al ataque oxidativo y además disminuye el daño oxidativo secundario tanto en proteínas (Prot. ox.) como en el ADNmt. MDA = malondialdehído; MitROS = ROS mitocondriales.*

Si la velocidad del envejecimiento está controlada en parte por la producción mitocondrial de radicales libres, es muy importante aclarar cual es el sitio de producción implicado dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Se sabe por estudios anteriores que, en el caso de las mitocondrias cardiacas, la producción de ROS ocurre tanto en el complejo I como en el complejo III. Sin embargo, de esos dos complejos, sólo el complejo I está implicado en el descenso de producción de radicales libres que ocurre en la restricción calórica, ya que dicho descenso ocurre cuando se utilizan piruvato/malato como sustratos pero no cuando los electrones se introducen en la cadena respiratoria utilizando succinato en presencia de rotenona (29). También se ha aclarado otro aspecto importante, el meca-

nismo de dicho descenso, que no consiste en una simple disminución del consumo de oxígeno, ya que éste se mantiene inalterado en las mitocondrias de los animales restringidos. Lo que ocurre es que desciende la fuga de radicales libres (el porcentaje del total de electrones que fluye por la cadena que da lugar a ROS en vez de reducirse totalmente a agua en la citocromo oxidasa). Esto está relacionado con grado de reducción electrónica del generador de ROS del complejo I, ya que la diferencia entre animales restringidos y controles se da cuando dicho grado de reducción es parcial pero no cuando es total (29). Se han encontrado resultados similares a los anteriores en mitocondrias hepáticas, con la diferencia de que los cambios se producen antes en este órgano, siendo ya detectables a las seis semanas de restricción (30). Estudios recientes en corazón de rata indican que la restricción calórica también disminuye los niveles de modificación oxidativa de las proteínas mitocondriales (43).

CONCLUSIONES

La información disponible sugiere que la relación entre el estrés oxidativo y la longevidad animal se debe en gran medida a la menor producción mitocondrial de radicales de oxígeno de las especies longevas. Esto se complementa con una menor sensibilidad a la peroxidación lipídica en los animales longevos, debida al menor grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas celulares. Es llamativo que la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial estén disminuidos tanto en los animales longevos como en los restringidos. Esto sugiere que la disminución de la intensidad de generación de radicales de oxígeno en el complejo I es un mecanismo evolutivo muy conservado que se utiliza para disminur la velocidad del envejecimiento y para aumentar la longevidad máxima.

AGRADECIMIENTOS

Los estudios descritos en este trabajo han sido subvencionados en parte por los proyectos SAF2002-01635 y BFU2005-02584 del Ministerio de Educación y Ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

(1) HARMAN, D. (2003): The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5: 557-561.

(2) BARGER, J. L.; WALFORD, R. L. y WEINDRUCH, R. (2003): The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exper Gerontol.* 38: 1343-1351.

(3) BARJA, G. (2004): Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological Rev.* 79: 235-251.

(4) BARJA DE QUIROGA, G.; LÓPEZ-TORRES, M. y PÉREZ-CAMPO, R. (1992): Relationship between antioxidants, lipid peroxidation and aging. en: Free Radicals and Aging (Emerit, I. y Chance, B., Eds.), pp. 109-123. Birkhäuser, Basel.

(5) TOLMASOFF, J. M.; ONO, T. y CUTLER, R. G. (1980): Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *PNAS USA* 77: 2777-2781.

(6) PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.; CADENAS, S.; ROJAS, C. y BARJA, G. (1998): The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B,* 168: 149-158.

(7) SOHAL, R. S.; SOHAL, B. H. y BRUNK, U. T. (1990): Relationship between antioxidant defenses and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 53: 217-227.

(8) HUANG, T. T.; CARLSON, E. J.; GILLESPIE, A. M.; SHI, Y. y EPSTEIN, C. J. (2000): Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J. Gerontol.* 55A: B5-B9.

(9) JAARSMA, D.; HAASDIJK, E. D.; GRASHORN, J. A. C.; HAWKINS, R.; VAN DUIJN, W.; VERSPAGET, H. W.; LONDON, J. y HOLSTEGE, J. C. (2000): Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1): overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol. Disease* 7: 623-643.

(10) MOCKETT, R. J.; SOHAL, R. S. y ORR W. C. (1999): Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not in normoxia. *FASEB J* 13: 1733-1742.

(11) WISPE, J. R.; WARNER, B. B.; CLARCK, J. C.; DEY, C. R.; NEUMAN, J.; GLASSER, S. W.; CRAPO, J. D.; CHANG, L. Y. y WHITSETT, J. A. (1992): Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J. Biol. Chem.* 267: 23937-23941.

(12) HUANG, T. T.; CARLSON, E. J., GILLESPIE, A. M.; SHI, Y. y EPSTEIN, C. J. (2000): Ubiquitous overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase does not extend life in mice. *J. Gerontol.* 55A: B5-B9.

(13) HO, Y. S.; GARGANO, M.; CAO, J.; BRONSON, R. T.; HEIMLER, I. y HUTZ, R. J. (1998): Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273: 7765-7769.

(14) CARLSSON, L. M.; JONSSON, J.; EDLUND, T. y MARKLUND, S. L. (1995): Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *PNAS USA* 92: 6264-6268.

(15) REDDY, V. N.; GIBLIN, F. J.; LIN, L. R.; DANG, L.; UNAKAR, N. J.; MUSCH, D. C.; BOYLE, D. L.; TAKEMOTO, L. J.; HO, Y. S.; KNOERNSCHILD, T.; JUENEMANN, A. y LUTJEN-DRECOLL, E. (2001): Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 3247-3255.

(16) TSAN, M. F.; WHITE, J. E.; CASKA, B.; EPSTEIN, C. J.; LEE, C. Y. (1998): Susceptibility of heterozygous MnSOD gene-knockout mice to oxygen toxicity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 114-120.

(17) MELOV, S.; COSKUN, P.; PATEL, M.; TUINSTRA, R.; COTTRELL, B.; JUN, A. S.; ZASTAWNY, T. H.; DIZDAROGLU, M.; GOODMAN, S. I.; HANG, T. T.; MIZIORKO, H.; EPSTEIN, C. J. y WALLACE, D. C. (1999): Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *PNAS USA* 96: 846-851.

(18) KU, H. H.; BRUNK, U. T. y SOHAL, R. S. (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad. Biol. Med.* 15: 621-627.

(19) BARJA G. (2004): Free radicals and aging. *Trends Neuroscience,* 27: 595-600.

(20) BARJA, G. y HERRERO, A. (2000): Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14: 312-318.

(21) RICHTER, CH.; PARK, J. W. y AMES, B. N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *PNAS USA* 85: 6465-6467.

(22) BARJA, G. (2000): The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin. Exper. Res.* 12: 342-355.

(23) KIM, S. R.; MATSUI, K.; YAMADA, M.; KOHNO, T.; KASAI, H.; YOKOTA, J. y NOHMI, T. (2004): Suppression of chemically induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human OGG1 gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase. *Mutat. Res.* 554: 365-374.

(24) COUTURE, P. y HULBERT, A. J. (1995): Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J. Membr. Biol.* 148: 27-39.

(25) PAMPLONA, R.; PRAT, J.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M. y BARJA, G. (1996): Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from longevous species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.* 86: 53-66.

(26) PAMPLONA, R.; BARJA, G. y PORTERO-OTÍN, M. (2002): Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. A homeoviscous-longevity adaptation? *Ann New York Acad. Sci.* 959: 475-490.

(27) PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M.; SANZ, A.; REQUENA, J. y BARJA, G. (2004): Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exper Gerontol.* 39: 725-733.

(28) LEE, C. K.; PUGH, T. D.; KLOPP, R. G.; EDWARDS, J.; ALLISON, D. B., WEINDRUCH, R. y PROLLA, T. A. (2004): The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Rad. Biol. Med.* 36: 1043-1057.

(29) GREDILLA, R.; SANZ, A.; LÓPEZ-TORRES, M. and BARJA, G. (2001): Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers

oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J*. 15: 1589-1591.

(30) GREDILLA R.; BARJA, G. y LÓPEZ-TORRES, M. (2001): Effect of short-term caloric restriction on H_2O_2 production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 279-287.

(31) LÓPEZ-TORRES, M.; GREDILLA, R.; SANZ, A. y BARJA, G. (2002): Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Rad. Biol. Med*. 32: 882-889.

(32) DREW, B.; PHANEUF, S.; DIRKS, A.; SELMAN, C.; GREDILLA, R.; LEZZA, A.; BARJA, G. y LEEUWENBURGH, C. (2003): Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Amer J. Physiol.* 284: R474-R480.

(33) GREDILLA, R.; PHANEUF, S.; SELMAN, C.; KENDAIAH, S.; LEEUWENBURGH, C. y BARJA G. (2004): Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria. *Ann. New York Acad. Sci.* 1019: 333-342.

(34) RAMSEY, J. J.; HAGOPIAN, K.; KENNY, T. M.; KOOMSON, E. K.; BEVILACQUA, L.; WEINDRUCH, R. y HARPER, M. E. (2004): Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am. J. Physiol*. 286: E31-E40.

(35) BEVILACQUA, L.; RAMSEY, J. J.; HAGOPIAN, K.; WEINDRUCH, R. y HARPER, M. E. (2004): Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol*. 286: E852-E861.

(36) JUDGE, S.; JUDGE, A.; GRUNE, T. y LEEUWENBURGH C. (2004): Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am. J. Physiol*. 286: R254-R259.

(37) SANZ, A.; CARO, P. y BARJA, G. (2004): Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36: 545-552.

(38) SOHAL, R. S.; KU, H. H.; AGARWAL, S.; FORSTER, M. J. y LAL, H. (1994): Oxidative damage,mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction. *Mech. Ageing Dev.* 74: 121-133.

(39) WEINDRUCH, R.; KAYO, T.; LEE, C. L. y PROLLA, T. A. (2001): Microfile profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J. Nutr*. 131: 918S-923S.

(40) FORNACE, A. J. JR.; ZMUDKA, B.; HOLLANDER, M. C. y WILSON, S. H. (1989): Induction of ß-polymerase mRNA by DNA-damaging agents in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 9: 851-853.

(41) PAYNE, A. y CHU, G. (1994): Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mut. Res*. 310: 89-102.

(42) PETRINI, J. H. (1999): The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular damage response. *Am. J. Hum. Genet*. 64: 1264-1269.

(43) PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M.; BELLMUNT, M. J; GREDILLA, R. y BARJA G. (2002): Aging increases $N^{epsilon}$-(Carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases $N^{epsilon}$-(Carboxyethyl)lysine and $N^{epsilon}$-(Malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Rad. Res*. 36: 47-54.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 799-812

Revisión

Elaboración por terceros en la formulación magistral. ¿Hasta dónde llega?*

ELVIRA BEL
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona

RESUMEN

En el trabajo se realiza un estudio comparativo de cómo regulan España, Alemania y Francia le elaboración por terceros en la realización de fórmulas magistrales. Se analizan en qué situaciones puede realizarse y qué establecimientos pueden llevarlo a cabo.

Palabras clave: formulación magistral.

SUMMARY

Participation by a third party in the practice of pharmacy compounding. How far does it go?

The present paper is a comparative study of how regulate Spain, Germany and France the participation by a third party in the practice of pharmacy compounding. It is analysed in which situations this participation can be carried out and what establishments are authorized to do this.

Key Words: pharmacy compounding.

* Toma de Posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, el 20 de enero de 2005.

INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores (1) hemos analizado la Ley del Medicamento en lo que respecta a la elaboración de fórmulas magistrales, sin embargo en los últimos tiempos se han suscitado una serie de comentarios en relación con lo que podemos denominar la elaboración por terceros en la formulación magistral, por lo que parece oportuno analizar este punto en concreto, comparándolo con la situación en otros Estados miembros de la Unión Europea, como son Alemania y Francia.

1. España

Es sobradamente conocido que las fórmulas magistrales han de elaborarse en la misma oficina de farmacia o servicio farmacéutico que se dispensan, de acuerdo con lo establecido en el artículo 8.9 de la Ley del Medicamento (LM) (2) (...preparada por el farmacéutico o bajo su dirección... dispensado en su oficina de farmacia o servicio farmacéutico) y con el artículo 12.4 del Real Decreto 1910/1984 (3), que regula la receta médica, en el que se obliga anotar la receta en la que se prescribe la fórmula magistral en el libro recetario de la oficina de farmacia que la dispensa.

Sin embargo, la misma Ley del Medicamento en su artículo 35.2 especifica que las fórmulas magistrales deberán elaborarse en las oficinas de farmacia y servicios farmacéuticos legalmente establecidos y que dispongan de los medios necesarios para su preparación de acuerdo con las exigencias establecidas en el Formulario Nacional. La primera edición del mismo ha sido aprobada recientemente por Orden de 18 de noviembre (4), mientras que las Normas de Correcta Elaboración y Control de Calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales fueron aprobadas por Real Decreto 175/2001 (5), y en las que se establecen los requisitos humanos y materiales para la realización de las mismas. El Colegio Oficial de Farmacéuticos de Valencia recurrió el Real Decreto, por entender que éste no podía establecer los requisitos sanitarios que debían cumplir las fórmulas magistrales porque la Ley del Medicamento lo reserva al Formulario Nacional y que el establecimiento de estos requisitos es competencia de la Comu-

nidad Autónoma; el Tribunal Supremo, en sentencia de 25 de septiembre de 2002 (6), lo rechaza y aclara que la Generalitat Valenciana, de acuerdo con lo que establecen sus Estatutos, tiene competencias sobre ordenación farmacéutica, la determinación de las condiciones del local y utillaje utilizado en la elaboración de medicamentos, al ser parte de su fabricación, su reglamentación corresponde al Estado, puesto que éste tiene competencia exclusiva en la legislación sobre productos farmacéuticos, garantizándose así «con cierta uniformidad, el procedimiento de información y dispensación al consumidor en cuanto a las fórmulas y productos de esta clase, elaborados en una multiplicidad de establecimientos farmacéuticos».

De acuerdo con lo expuesto debe concluirse que están autorizadas a elaborar fórmulas magistrales las oficinas de farmacia y servicios farmacéuticos que tengan los medios necesarios; en el caso que no dispongan de los medios necesarios, la misma Ley del Medicamento, en el artículo 35.2 párrafo segundo (7), contempla la posibilidad de encomendar a una entidad legalmente autorizada para tal fin la realización de alguna fase de la formulación magistral. El texto especifica lo siguiente:

> «No obstante, las oficinas de farmacia y servicios farmacéuticos que no dispongan de los medios necesarios, excepcionalmente y sin perjuicio de lo establecido en el artículo 76.2, podrán encomendar a una entidad legalmente autorizada para tal fin por la Administración sanitaria competente, la realización de una o varias fases de la elaboración y/o control de fórmulas magistrales».

Curiosamente el artículo 76.2 de la Ley del Medicamento lo expone de forma análoga, pero con unas diferenciaciones: «excepcionalmente, y *cuando así lo requiera la atención a los pacientes,* los Servicios de Farmacia y Oficinas de Farmacia podrán encomendar, a una entidad legalmente autorizada por el *Ministerio de Sanidad y Consumo,* la realización de alguna fase...»

Analicemos algunos de estos puntos de controversia.

A) *¿Qué establecimientos podrá Sanidad autorizar para este fin y cuándo se va a permitir?*

Los dos artículos de la Ley dejan bien claro que será excepcionalmente, incluso el artículo 76.2, añade y cuando lo requiera la atención al paciente. Ya en otro trabajo comentamos que no debiera la excepcionalidad transformarse en norma general (8) y que sólo deberá autorizarse la realización de una o varias fases de la elaboración y control.

En cuanto a qué establecimientos podrá Sanidad dar la autorización, ha de entenderse que se deberá seguir lo establecido en la legislación vigente, por tanto es obvio analizar qué establecimientos tienen capacidad para elaborar medicamentos; en la actualidad son los laboratorios farmacéuticos para las especialidades farmacéuticas y las oficinas de farmacia y servicios farmacéuticos para las fórmulas magistrales y preparados oficinales. El Real Decreto de 1992, que regula la autorización de los laboratorios farmacéuticos (9), dispone que éste es de aplicación a todas aquellas personas físicas y jurídicas que se dedican a la fabricación industrial de medicamentos, exceptuando la elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficinales realizados, únicamente con vistas a su venta al por menor, por farmacéuticos en una oficina de farmacia y para las preparaciones, divisiones y cambios de acondicionamiento o de presentación que se realicen por las farmacias de los hospitales en el ámbito de sus funciones. Los distribuidores farmacéuticos no tienen autorización para la elaboración de medicamentos tan sólo si se dedican a la distribución de las materias primas pueden realizar los análisis de control de las mismas, de acuerdo con lo que establece el apartado 4.1.3.2 de las Normas de Correcta Elaboración y Control de Calidad (NCE y CC).

En este sentido se pronuncia el Tribunal Superior de Justicia de Sevilla en la sentencia de 5 de julio del 2001 (10), que ratifica la sanción por infracción grave (multa de 500.001 ptas., 3.005,07 €) por elaboración de fórmulas magistrales fuera de las oficinas de farmacia por parte de un distribuidor farmacéutico que lo realizaba a petición de los farmacéuticos elaboradores (cooperativistas) que no tenían los medios, constando en su etiquetado los datos de los mismos.

Por el interés se comentan algunos de los puntos de la sentencia.

La defensa de la Cooperativa alega que la mencionada entidad no elaboraba la fórmula magistral sólo se limitaba a poner su laboratorio a disposición de los cooperativistas, entendiendo que esta actividad esta amparada en la legislación reguladora de cooperativas.

El Tribunal entiende que de acuerdo con el artículo 35.4 de la LM, las fórmulas magistrales no sólo deben dispensarse en las oficinas de farmacia, sino también su «elaboración debe localizarse "en las oficinas de farmacia", sin que esta expresión deba entenderse en un sentido meramente figurado que pudiera justificar la elaboración por el farmacéutico titular del establecimiento dispensador en otro lugar con los medios adecuados, pues esta interpretación se compadecería mal con la naturaleza de la oficina de farmacia como establecimiento sanitario privado de interés público y con las funciones que se le asignan en la Ley 16/1997, de 25 de abril, de regulación de los Servicios de las Oficinas de Farmacia, norma cuya exposición de motivos contempla que en la farmacia se elaboren las fórmulas magistrales considerándose que el farmacéutico titular debe prestar en el establecimiento, como servicio básico, dicha elaboración (art. 1.4). Ese carácter de establecimiento sanitario con características específicas implica que el farmacéutico titular de la oficina de farmacia está obligado a dotar al establecimiento el instrumental necesario para la elaboración de fórmulas magistrales pero también que no cabe su elaboración fuera de las oficinas de farmacia y al margen que ésta tenga lugar por el farmacéutico titular o bajo su dirección».

El Tribunal, más adelante, realiza unas aclaraciones que confirman nuestra opinión con relación a la excepcionalidad establecida en el artículo 76.2 de la LM, indicando que ésta se puede llevar a cabo pero sólo en alguna fase de la elaboración; la sentencia señala:

> «No cabe invocar a los efectos que nos ocupan la posibilidad excepcional a la que se refiere el artículo 76.2 de la Ley del Medicamento, pues, primero, no está acreditada esa situación excepcional a la que se refiere el precepto —la adecuada atención a los pacientes y no el beneficio de los titulares de las oficinas de farmacia—, segundo, se refiere el mismo a una mera fase de producción y no de la completa elaboración de la especialidad y tercero, el establecimiento regentado por la entidad actora carecía de la autorización necesaria».

Por último, el Tribunal indica que no se puede fundamentar la acción sancionada en lo establecido en la Ley 3/1987, de 2 de abril, General de Cooperativas, en lo que respecta a las actividades de colaboración sobre adquisición, elaboración, mantenimiento de maquinaria, instrumentos, instalaciones, etc., que se consideren convenientes o necesarios para el desarrollo de las actividades profesionales de los socios, pues es obvio que en tales actuaciones se han de observar las prescripciones impuestas en la normativa específica reguladora de la concreta actividad profesional. Se vuelve a insistir, por tanto, en el principio que la Ley específica prevalece sobre la general.

Respecto a lo expuesto se podría argumentar, que la sentencia resuelve una sanción anterior a la modificación de la Ley del Medicamento realizada por la Ley 24/2001, sin embargo, los fundamentos del Tribunal son totalmente aplicables a la nueva normativa, puesto que el principio de la Ley del Medicamento no queda alterado con la modificación señalada.

Una sentencia anterior, del Tribunal Supremo de 7 de noviembre de 1991 (11), incide en el hecho que la elaboración de fórmulas magistrales es cometido exclusivo de oficinas de farmacia y servicios farmacéuticos, al sancionar a un laboratorio farmacéutico por elaboración y venta reiterada de un producto farmacéutico que no reunía los requisitos de fórmula magistral y que tampoco tenía la autorización e inscripción en el registro de especialidades farmacéuticas. Esta sanción respondía a la elaboración de preparaciones especiales que los servicios de farmacia encargan a los laboratorios. Práctica habitual, incluso aceptada, incomprensiblemente, por la Administración sanitaria, como lo demuestra el escrito de 28 de agosto de 1991 de la DGFPS al Servicio de Farmacia de un Hospital, en el que se indica que «el laboratorio... dispone de una solución... (solución parenteral) similar a la solicitada, como fórmula magistral. Sugerimos al solicitante que se ponga en contacto con dicho laboratorio para poder obtener el preparado».

De acuerdo con todo lo expuesto debe concluirse que los establecimientos autorizados para la realización de una o varias fases de la elaboración de una fórmula magistral serán oficinas de farmacia y servicios farmacéuticos con medios. Los distribuidores farmacéuti-

cos únicamente podrán realizar el control analítico de las materias primas, siempre que dispongan de laboratorio acreditado.

Ahora bien, en el caso que se pueda aceptar que alguna fase de la elaboración se realice por una entidad autorizada para tal fin, las Normas de Correcta Elaboración y Control de Calidad (5) en el punto 5.2.5 aclaran que la relación entre la farmacia y la entidad deberá formalizarse mediante contrato en el que deberán establecerse claramente las obligaciones de cada parte. Del texto ha de interpretarse que cada fórmula requerirá un contrato, que puede servir a la vez de solicitud de petición al tercero. Las NCECC no especifican cómo se realizará el contrato sin embargo algunas Comunidades Autónomas como País Vasco, Valencia, Cataluña, etc., han elaborado Guías para la aplicación de las normas contenidas en el Real Decreto 175/2001 (12), en las que se adjunta como anexo el modelo de contrato.

El contrato va a ser fundamental desde el punto de vista de la responsabilidad que asumirá cada uno. Sin embargo, el farmacéutico ha de tener presente que la responsabilidad de la calidad de la fórmula magistral o del preparado oficinal corresponde al farmacéutico preparador, así lo referencia el punto 4.1.3.1 de las NCECC, por lo que considera conveniente que éste verifique, como mínimo la identidad de las materias; es decir en caso de denuncia, el consumidor lo haría del farmacéutico responsable de la farmacia y a partir de aquí podría alegarse documentalmente las fases en las que interviene otro centro.

B. *¿Quién autorizará?*

Nos encontramos que en un artículo de la Ley dispone que la autorización debe realizarla la Administración sanitaria competente y en el otro el Ministerio de Sanidad y Consumo; esto ha provocado distintas interpretaciones en las Comunidades Autónomas, cuyas administraciones sanitarias han entendido, en unos casos, que es de su competencia el autorizar a dichas entidades la elaboración de alguna fase de la formulación magistral, mientras que otras consideran que debe ser el Ministerio de Sanidad. Sin duda, el primer término es más ajustado, puesto que en el caso que sea una oficina de farmacia o un servicio farmacéutico los que soliciten ser los elaboradores de una o varias fases de una fórmula magistral, la autoriza-

ción ha de entenderse que es competencia de la Administración sanitaria de la Comunidad Autónoma. Ello ha motivado que algunas de ellas hayan publicado normativa en desarrollo al Real Decreto 175/2001, como Baleares, Navarra, Cataluña, La Rioja, Murcia, Aragón y Extremadura.

2. Situación en otros países

A continuación se expone el estudio comparativo de la fabricación por terceros en Francia y Alemania para poder analizar y discutir nuestra propia reglamentación.

A) *Francia*

El artículo L5125-20 del CSP (13) dispone que en todos los casos los medicamentos deben ser preparados por un farmacéutico o bajo la vigilancia directa de él. Esta regla comporta que en Francia se mantenga la dirección técnica de los laboratorios farmacéuticos a cargo de un farmacéutico. Los artículos L4241 (del 1 al 11) al regular la figura de los «préparateuers en pharmacie» indican que éstos sólo están autorizados a colaborar con el titular de la oficina y los otros farmacéuticos en la preparación y dispensación de medicamentos de uso humano y veterinario. Estarán bajo el control y responsabilidad de un farmacéutico. Se tiene referencia (14) de condena a un titular de oficina de farmacia por el «tribunal correctionnel» d'Aix –en-Provence de dejar preparar, sin la vigilancia directa, medicamentos por personal no farmacéutico.

En el caso de la formulación magistral sigue por tanto la misma obligatoriedad, lo que lo asemeja a la normativa española.

La legislación francesa no menciona si las fórmulas magistrales han de ser elaboradas en la misma farmacia que las dispensa, pero ha de entenderse puesto que admite que los controles puedan realizarlos otros, pero no la identificación de las materias primas porque de acuerdo con lo que disponen los artículos 212-1 y 221-1 del «Code de la consommation» (15) ésta es una responsabilidad del profesional que pone el producto en el mercado.

Art. L 212-1:

«Desde la primera puesta en el mercado los productos deben responder a las reglas vigentes relativas a la seguridad y a la salud de las personas, a la lealtad de las transacciones comerciales y a la protección del consumidor.

Los responsables de la primera puesta en el mercado de un producto están obligados a verificar que los mismos son conformes a las reglas vigentes».

A solicitud de los agentes habilitados para aplicar el presente libro, se tendrá que justificar las comprobaciones y controles efectuados.

Art. L 221-1:

«Los productos y los servicios deben, en las condiciones normales de utilización o en otras condiciones razonablemente previsibles por el profesional, presentar la seguridad a la que legítimamente se puede esperar y no deben atentar a la salud de las personas».

Por otro lado el artículo L 5121-6 del CSP establece la obligatoriedad que las materias primas cumplan las exigencias de la farmacopea:

«Para la ejecución de las preparaciones mencionadas en los puntos 1.º, 2.º y 3.º (fórmulas magistrales, preparaciones hospitalarias y preparados oficinales) sólo podrán utilizarse las materias primas que respondan a las especificaciones de la farmacopea, salvo en caso de no disponibilidad de materias primas disponibles y adaptadas a la realización de la preparación consideradas respondiendo a dichas especificaciones».

Por tanto, parece lógico que en el caso que el farmacéutico no pueda responder a estas especificaciones pueda recurrir al subcontrato; sin embargo aunque éste no esté prohibido las «instancias ordinarias» no son muy favorables (Cons. national 4 juillet 1989: Bull Ordre pharm, 1989, n.º 321, pág. 806) (16), en realidad sólo se toleran cuando el farmacéutico no dispone de los medios necesarios para asegurar la calidad de la preparación.

Les Bonnes Practiques de préparations oficinales» (17) si que contemplan la fabricación por terceros o «subcontrato», indicando que deberá existir un contrato en el que se delimite las operaciones y verificaciones. El farmacéutico que encarga la fórmula, una vez recibida, anotará en su registro de preparaciones: los datos del farmacéutico subcontratado y el etiquetado de la fórmula indicará los datos de los dos farmacéuticos. Este punto sería interesante tenerlo en cuenta en España y que el farmacéutico al pasar la receta en el libro recetario figurase el contrato en observaciones.

Un punto que conviene destacar de la legislación francesa es la elaboración de medicamentos por los servicios de farmacia de hospital puesto que en determinados aspectos se les aplica una legislación específica, como derecho positivo abierto que facilita la elaboración por parte de estos servicios y dispensarlo a otros servicios de farmacia de hospital.

El artículo L5126-2 del CSP menciona la posibilidad excepcional de proveer un servicio de farmacia de hospital y de realizar preparaciones para otros servicios e incluso a otros establecimientos mencionados en el artículo L5126-1, así como a profesionales sanitarios «liberales» (en ejercicio libre) que participen en sedes de salud mencionados en el artículo L6321-1:

> «Por lo establecido en las disposiciones del primer párrafo del artículo L5126-1, cuando no hay otro sistema posible de aprovisionamiento de un medicamento o producto determinado, el director de la agencia regional de la hospitalización puede autorizar, para una duración limitada, que un establecimiento público de salud o un establecimiento privado concertado provea a otras farmacias hospitalarias. La autorización se concederá previo conocimiento del director regional de asuntos sanitarios y sociales.
>
> No obstante, por necesidad imperiosa e inmediata, el suministro puede efectuarse sin la autorización prevista en el párrafo anterior, bajo reserva de informar lo antes posible al representante del Estado y al director regional de asuntos sanitarios y sociales.
>
> Excepcionalmente, en caso de necesidad, el representante del Estado del departamento, previa información del director

> regional de asuntos sanitarios y sociales, puede autorizar, para una duración limitada, a los establecimientos públicos de salud a vender al detalle medicamentos cuando no hay otro procedimiento posible de distribución.
>
> En caso de urgencia, los establecimientos sanitarios públicos están autorizados a vender al por mayor, en las mejores condiciones financieras, los medicamentos no disponibles en otra parte a las organizaciones con fines no lucrativos o humanitarios, admitidos por la autoridad administrativa...
>
> El mismo artículo L5126-2 también autoriza de forma excepcional y bajo autorización a que los establecimientos farmacéuticos de los centros de salud soliciten bajo contrato la realización de preparaciones hospitalarias a establecimientos farmacéuticos autorizados para la fabricación de medicamentos».

B) *Alemania*

En Alemania el artículo 2.2 de la Reglamentación de la Ley de farmacia (18) obliga a que el farmacéutico titular dirija personalmente su farmacia y a que se cumpla todo lo establecido en el reglamento, y en el artículo 6.4 limita la intervención en la elaboración de medicamentos a personal no farmacéutico o técnico-farmacéutico sólo en el envasado y etiquetado de los mismos:

> «El llenado y empaquetado, así como el etiquetado de los medicamentos puede realizarse, bajo supervisión de un farmacéutico, por personal no farmacéutico».

Es decir, la legislación alemana es muy estricta en lo referente a la elaboración porque no sólo exige la presencia del farmacéutico, sino que le obliga a realizar personalmente gran parte de la fórmula, a excepción de la preparación como «Gorssherstellung» [*] en la que se

[*] La legislación alemana establece tres tipos de preparaciones en las oficinas de farmacia: Rezeptur, los medicamentos elaborados según la prescripción de un médico, odontólogo o veterinario. Defektur, medicamentos destinados a su uso en personas y que en base a una prescripción frecuente de médicos y dentistas se elabora en lotes de hasta 100 envases en el local de una oficina de farmacia y que se destinan a su dispen-

permite que lo elabore otro personal no farmacéutico bajo la dirección de un farmacéutico.

El artículo 6.3 de la Apothekenbetriebordnung (Reglamento de farmacia) (18) recoge explícitamente la posibilidad de realizar los controles fuera de la farmacia; el farmacéutico deberá comprobar al menos la identidad del medicamento y anotar los controles realizados:

> «El control de medicamentos puede llevarse a cabo fuera de la farmacia, bajo responsabilidad del farmacéutico director o responsable, en un establecimiento al que se le ha otorgado la autorización de acuerdo con el artículo 13 de la Ley del medicamento... El responsable del establecimiento encargado de la elaboración emitirá un certificado con los datos y resultados del análisis, indicando que el medicamento se ha analizado según las reglas farmacéuticas y demuestran calidad y seguridad. En la farmacia se comprobará al menos la identidad del medicamento...».

El artículo 13.1 de la Ley del medicamento (19) indica que requiere autorización de fabricación de medicamentos quien quiera elaborarlos profesional o industrialmente con el objetivo de suministrarlos a otras personas. No necesitan permiso el propietario de una oficina de farmacia y el responsable de un hospital, si de acuerdo con la ley de farmacia en el mismo se pueden administrar medicamentos, el veterinario en el espacio de la instalación del botiquín veterinario en determinadas circunstancias (el reetiquetado, reenvasado, reempaquetado, que también pueden realizarlo mayoristas y minoristas éstos últimos sólo para medicamentos de venta libre y siempre que cumplan unas condiciones).

CONCLUSIÓN

Del estudio comparativo de los tres países se desprende que en Francia y España la elaboración de medicamentos en oficina de farmacia debe hacerse por el farmacéutico o bajo su dirección; en

---

sación en la misma. Grossherstellung, elaboración de lotes de medicamentos superiores a 100 envases, que deben seguir unos requisitos específicos y tener autorización.

Alemania la exigencia es mayor porque obligan a que el farmacéutico realice directamente toda la fórmula a excepción del envasado, empaquetado y etiquetado, que lo puede hacer un técnico no farmacéutico o incluso el veterinario para sus botiquines; en el caso de Grossherstellung se permite la elaboración a técnico no farmacéutico, pero bajo la dirección de éste.

De los tres países estudiados, España es la más permisiva en lo referente a elaboración por terceros puesto que permite la realización de una o varias fases de la elaboración y control fuera de la oficina de farmacia que dispensa, mientras que Francia y Alemania sólo permiten la realización de los controles, aunque ambas obligan a hacer el análisis de identificación al farmacéutico, que en España sólo se recomienda.

En Alemania se permite solicitar a los servicios de hospital y con autorización expresa que un establecimiento autorizado para la elaboración de medicamentos les realice la preparación hospitalaria.

BIBLIOGRAFÍA

(1) BONET, F., BEL, E. (2000, 2001): Estudio comparativo de la legislación sobre Formulación magistral (I). Regulación en España y Alemania. (II) Regulación en Estados Unidos y conclusiones. *Offarm*; 19 (11): 170-176; 20 (1): 126-130.
(2) Ley 25/1990 del medicamento, de 20 de diciembre, *BOE* del 22.
(3) Real Decreto 1910/1984, de 26 de septiembre, *BOE* del 29 de octubre, de receta médica.
(4) Orden SCO/3262/2003, de 18 de noviembre, *BOE* del 26, por la que se aprueba el Formulario Nacional.
(5) Real Decreto 175/2001, de 23 de febrero, *BOE* de 16 de marzo, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales. Modificado por Real Decreto 905/2003, de 11 de julio, *BOE* del 12.
(6) Sentencia del Tribunal Supremo (Sala de lo Contencioso-Administrativo, Sección 4.ª), de 25 de septiembre de 2002 (Aranzadi RJ 2003\752).
(7) Modificación de la Ley del Medicamento realizada por Ley 24/2001, de 27 de diciembre, *BOE* del 31, de medidas fiscales, administrativas y del orden social.
(8) BEL PRIETO, E. (2003): «Aspectos legales y de responsabilidad de la elaboración de medicamentos en los hospitales». *El farmacéutico hospitales* 143: 22-34.

(9) Real Decreto 1564/1992, de 18 de diciembre, *BOE* de 2 de febrero de 1993, corrección de errores en *BOE* de 11 de marzo, en el cual se desarrolla y regula el régimen de autorización de laboratorios farmacéuticos e importadores de medicamentos y la garantía de calidad de su fabricación industrial.
(10) Sentencia del Tribunal Superior de Justicia de Sevilla, Andalucía (Sala de lo Contencioso-Administrativo, Sección 3.ª), de 5 de julio de 2001. Recurso contencioso administrativo núm. 2748/1998. RJ Aranzadi, JUR 2001/307637.
(11) Sentencia del Tribunal Supremo, de 7 de noviembre de 1991, jurisdicción contencioso-administrativa (RJ Aranzadi 1991/8361).
(12) Guía para la aplicación de las normas contenidas en el Real Decreto 175/2001, de normas de correcta fabricación de fórmulas magistrales y preparados oficinales. Dirección de Farmacia. Departamento de Sanidad Vitoria-Gasteiz, 28 de mayo de 2003 (www.correofarmaceutico.com/documentos).
Guía de procedimiento de elaboración por terceros de fórmulas magistrales y preparados oficinales en el ámbito de la Comunidad Valenciana. Dirección General para la prestación farmacéutica. http://www2.san.gva.es/farmacia.
Guia sobre l'elaboració i control de formulas magistrales i preparats oficinals per encarrec d'una oficina de farmàcia o servei farmacèutic que no disposi de mitjans necessaris. 2.ª ed. Direcció General de Recursos Sanitaris (www.cofb.net)
(13) Code de la Santé Publique (Nouvelle partie legislative). Legisfrance.gouv.fr (20-08-2004).
(14) «Préparations magistrales dangereuses, manquements divers: Les Nouvelles Pharmaceutiques». *Bull. De l'Ordre des Pharmaciens* (1995), 348: 400.
(15) *Code de la Consommation*. Legisfrance.gouv.fr (20-08-2004).
(16) Para mayor información ver: DELETRAZ, M. y VIALA, G.: «Les medicaments officinaux». En *Droit Pharmaceurtique*. Litec (2002). Módulo 42.
(17) Bonnes Practiques de préparations oficinales. Ministère des affaires Sociales et de l'emploi. Ministère chargé de la Santé et de la famille. Direction de la Pharmacie et du Medicament. Bulletin Officiel n.º 88/7 bis. Han de considerarse de recomendación, puesto que no están aprobadas por Orden Ministerial, tal como exige el artículo L5121-5 del CSP: «La preparación, importación y distribución de medicamentos debe realizarse de conformidad con las buenas prácticas donde los principios son definidos por Orden del Ministro encargado de la Salud».
(18) Verordnung uber den Betrieb von Apotheken (Apothekenbetriebsordnung: Reglamento sobre la explotación de las farmacias) de 9 de febrero de 1987 (BGBL I:547) Modificaciones posteriores en http//www.aporecht.de/ (10-12-2005).
(19) Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Ley sobre el Comercio de Medicamentos) de 19 de octubre de 1994, BGBL, I: 3018. Con modificaciones posteriores (http://www.aporecht.de (10-12-2005).

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 813-819

Revisión

La verdadera historia de la Aspirina

MIGUEL F. BRAÑA[1], LUIS A. DEL RÍO[2], CARMEN TRIVES[2] Y NURIA SALAZAR[2]

[1]*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia e Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC)*

[2]*Departamento de Farmacología, Tecnología y Desarrollo Farmacéutico*
Facultad de Farmacia
Universidad San Pablo-CEU- Montepríncipe

RESUMEN

Desde la mitad de los años treinta del siglo pasado, se ha considerado erróneamente que la Aspirina había sido descubierta por Felix Hoffmann, sin embargo recientes estudios reconocen a Arthur Eichengrün como el autor más importante. En este artículo se describe una breve historia del fármaco y cómo las pasiones políticas la modificaron.

Palabras clave: Aspirina.—Historia.—Eichengrün.—Ácido acetilsalicílico.—AAS.

ABSTRACT

The reliable history of Aspirin

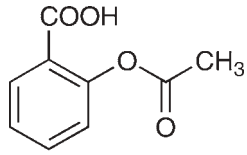
From the thirties of last century, the Aspirin has been wrongly considered as a Felix Hoffmann discovering. Nevertheless, recent research has put in evidence that the true inventor of this drug has been Arthur Eichengrün. In this paper, a short history of the drug is described, as well as the political interferences on it.

Key words: Aspirin.—History.—Eichengrün.—Acetilsalicilic acid.—ASA.

INTRODUCCIÓN

La Aspirina es, prácticamente desde su introducción, el fármaco más popular del mundo. Constituye o ha constituido el «analgésico de bolsillo» genuino, siendo rara la casa donde no existe al menos un envase de alguna de las formas de dicho medicamento o de alguno de sus genéricos. Nuestro gran filósofo, José Ortega y Gasset sentía tal admiración por ella que denominó a nuestra época como la *Era de la Aspirina*.

El nombre de Aspirina está registrado para el producto de Laboratorios Bayer y el principio activo es el ácido acetilsalicílico **1** (Fig. 1). En las farmacopeas norteamericana y británica, e incluso en el Index Merck, no se emplea la Denominación Común Internacional (INN) para dicho principio activo, sino que aparece como Aspirin.



1

FIGURA 1. *Ácido acetilsalicílico.*

Los salicilatos poseen, entre otras, acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Estas actividades ya fueron conocidas entre los egipcios. En el año 1862, un arqueólogo y comerciante en antigüedades inglés Edwin Smith, adquirió unos rollos de papiro correspondientes al año 1534 a.C., que constituían un tratado de medicina de la época (actualmente se conserva en Nueva York con el nombre de *Papiro de Smith*). En dicho tratado se establecen principalmente una serie de tratamientos quirúrgicos, que se acompañan con algunos métodos curativos a base de plantas medicinales. Una de ellas, la corteza del *Tyeret*, o sauce blanco (*Salix alba L.*), que crecía salvaje en los humedales del Nilo. También en el famoso *Papiro de Ebers* se contempla el uso del sauce. En la antigua china era conocida la actividad de la madera de sauce para tratar a los enfermos reumá-

ticos. Precisamente, la observación de que dicho árbol habitaba en las zonas húmedas, con las raíces encharcadas sin padecer trastorno alguno, pudo ser el origen de que, a lo largo de los años, se relacionasen sus propiedades terapéuticas con la *enfermedad producida por la humedad en los pies*, nombre con el que se conocía a ciertas fiebres de carácter reumático, por lo que debió animar a su utilización entre los médicos de la época.

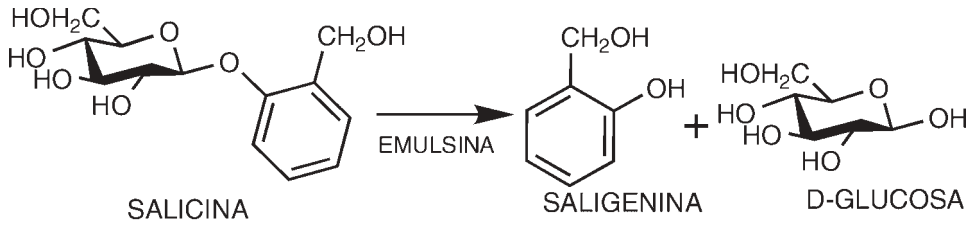
El libro de Dioscórides *Materia Médica* recoge en su primer tomo la actividad del sauce para tratar diversos estados patológicos relacionados con el dolor, describiendo el uso tanto de la corteza, como de las hojas, del zumo, de las semillas y del fruto.

Durante la Edad Media la corteza del sauce se utilizó como febrífugo en la medicina popular, en forma de infusión. En algunos países se prohibió su empleo para proteger a los artesanos de la industria manufacturera de artículos de mimbre, como rejillas, cestos, etc., alegando razones ecológicas.

En el año 1763, el médico y sacerdote inglés Edward Stone realizó un ensayo clínico con 50 feligreses enfermos de fiebres reumáticas a los que administró una infusión del polvo seco de la corteza del sauce. Stone presentó el resultado de su ensayo ante lo más granado de la sociedad de Londres, el 2 de junio de ese mismo año. El curioso argumento que convenció a los asistentes a la sesión era el sabor amargo de la infusión, lo que la asemejaba con las infusiones del polvo de la quina importado de Perú: a igualdad de amargor igualdad en la actividad febrífuga. Como además, las ramas del árbol son muy flexibles, la segunda indicación era el reumatismo.

El principio activo de la corteza del sauce, que también se encuentra en la de los árboles del género *Populus* y en la hierba conocida como «reina de los prados» (*Filipéndula* o *Spirea Ulmaria M.)* (1) está constituido por la salicina **2**, un glucósido del alcohol *o*-hidroxibencílico, que por hidrólisis con emulsina conduce al aglicón saligenina **3**, un profármaco del ácido salicílico (Fig. 2). La salicina fue aislada de la *Spirea* en el año 1826, por el químico italiano Ludovico Brugnatelli, precisamente el fundador de los *Annali di Chimica*. Tres años más tarde fue nuevamente obtenida de la corteza del sauce por el francés H. Leroux. Posteriormente A. A. T. Cahours, paisano del anterior y más conocido por haber preparado la nitrocumidina, un derivado de

la anilina de interés en la industria de los colorantes, oxidó la salicina al ácido salicílico. Parece ser que este último fue ensayado en humanos, pero que pronto se abandonó debido a la irritación que producía en el estómago. En el año 1853, ya en plena fiebre de la síntesis orgánica un químico de Estrasburgo, Charles von Gerhardt, acetiló el ácido e incluso demostró que el ácido acetilsalicílico AAS era mejor tolerado que ninguno de sus precursores u homólogos y que presentaba la misma actividad analgésica. A pesar de estos resultados, el nuevo producto quedó abandonado en el laboratorio, ya que Gerhardt no tenía interés en su comercialización. K. Kraut mejoró algo el procedimiento de éste en el año 1869, llegando a un ácido algo más puro.



2 **3**

FIGURA 2. *Hidrólisis de la salicina.*

En el año 1859, H. Kolbe describió el método industrial para la obtención del ácido salicílico por calefacción del fenol, obtenido por F. F. Runge del alquitrán de hulla unos años antes, con anhídrido carbónico y sosa a presión y a temperaturas entre 120 y 140º C. Esta síntesis hizo económicamente accesible al precursor de la aspirina (2).

Friedich Bayer fundó en la ciudad de Barmen en 1861, la que iba a ser la primera compañía química que realizara trabajos de investigación en Alemania. En la década de los ochenta decidió crear laboratorios con este objetivo, en sus nuevas instalaciones de Leverkusen, donde contrató a un discípulo de Adolf Baeyer, Carl Duisberg. En 1891 ya disponía de una docena de químicos en su laboratorio de investigación.

Arthur Eichengrün había nacido en Aachen (Aquisgrán) en el año 1867, hijo de un comerciante judío de telas, estudió química en la

universidad de su ciudad natal. Posteriormente viajó a Berlín y a Erlangen, doctorándose en esta última ciudad en 1890. Seis años más tarde Duisberg lo contrató, comenzando su trabajo en Bayer como director de la división química. Durante los doce años que permaneció en dicha compañía, dirigió la síntesis del ácido acetilsalicílico y de la diacetilmorfina o heroína.

Eichengrün abandonó Bayer en el año 1908, creando su propia empresa, la Cellon Werke, especializada en derivados del acetato de celulosa, con aplicación en la fabricación del «celuloide» no inflamable, películas fotográficas, lacas, etc., llegando a ser titular de casi 50 patentes (3).

Durante su estancia en Bayer, Eichengrün, animado por el conocimiento de que la acetilación disminuye la toxicidad de algunos productos, decidió encargar a Hoffmann, su ayudante de laboratorio, la síntesis de dos fármacos de interés, con problemas de tolerancia. El primero fue el ácido salicílico, que con un sabor amargo intenso y con su capacidad para producir vómitos, convertía en francamente molesta la toma del medicamento por el paciente reumático. El segundo, la morfina, con sus problemas de dependencia, siempre ha motivado la búsqueda de un opiáceo sin este efecto tóxico.

El 10 de octubre de 1897, Hoffmann preparó el AAS, conforme a las recetas de Gerhardt y Kraut, consiguiendo mejorar la pureza del producto terminado hasta la calidad farmacéutica. Dos semanas más tarde, preparó la heroína. Ambos productos fueron enviados a H. Dreser, el Jefe de Farmacología, que cuando probó ambos productos quedó tan impresionado con el segundo —¡como remedio para el resfriado común!— que rechazó el AAS, alegando que era cardiotóxico (probablemente fue la primera señal histórica de este tipo de toxicidad en un inhibidor de las COX). Profundamente disgustado por el rechazo, Eichengrün decidió ser el primero en probar el producto, por lo que comenzó a suministrárselo a sí mismo. Cuando comprobó que no le había afectado el corazón, repartió muestras del fármaco a varios médicos de Berlín, entre ellos varios odontólogos, que evaluaron muy positivamente el resultado clínico, a pesar de lo poco ortodoxo del ensayo. Uno de los médicos le comentó a Duisberg la validez del medicamento, por lo que éste llamó a Dreser

y le convenció de que iniciase la evaluación del AAS en animal de experimentación. El trabajo de laboratorio demostró el perfil farmacológico esperado y Dreser los publicó *como único autor* del descubrimiento (4). Se realizaron dos ensayos clínicos en Berlín y en Halle, que se publicaron en el mismo año y demostraron que el AAS era tan eficaz como el ácido salicílico, pero mucho mejor tolerado al carecer de los efectos indeseables de éste.

A la vista de los resultados clínicos, Bayer consideró la posibilidad de comercialización del AAS que al no poder ser patentado como producto, decidió solicitar una patente de procedimiento, donde se reivindicaba el método industrial de fabricación. La segunda decisión fue el registro de la marca, Aspirin®, nombre derivado de la A de acetilo, spir de la planta de la que se extrajo inicialmente el AAS, la *Spirea ulmaria,* y la terminación in para muchos medicamentos de la época. En el año 1934, Bayer pone en la patente americana como único inventor a Hoffmann y como tal ha sido reconocido hasta nuestros días (5).

Dos fenómenos influyeron en la falta de reconocimiento del mérito de Eichengrün en el descubrimiento de la aspirina: su salida de Bayer y el hecho de ser judío, por lo que los nazis, a principio de los años treinta, decidieron cambiar la historia y dar todo el crédito del descubrimiento a su ayudante, el ario Hoffmann. Por si esto fuera poco, inventaron la historia sentimental del sufrimiento de un padre reumático que no toleraba los salicilatos, por lo que le pidió al *gran químico* de su hijo que resolviera el problema (algunas versiones hablan de un tío en vez de su padre).

Eichengrün fue un hombre rico cuya empresa colaboraba —estaba casado con una mujer aria— con el régimen nazi, hasta que en 1943 cayó en desgracia y le condenaron inicialmente a cuatro meses de prisión para, finalmente, ser recluido en el campo de concentración de Theresienstadt, donde sufrió catorce meses, hasta que fue liberado por las tropas soviéticas.

En el año 1949, publicó en la revista *Pharmazie* (6) un artículo donde describe la verdadera historia del fármaco y que Hoffmann se limitó a seguir sus instrucciones, sin incluso saber el objetivo del trabajo, y que desde luego el medicamento no hubiera salido al mercado en 1899, si él no se hubiera esforzado. Lamentablemente,

Eichengrün murió dos semanas más tarde de la publicación de su trabajo, por lo que éste pasó al olvido.

En el año 1999, W. Sneader presentó la verdadera historia de la aspirina durante un mitin de la Royal Society of Chemistry (7). La investigación de los cuadernos de laboratorio de Bayer ha demostrado que la historia es verdadera (8).

En conclusión, el descubrimiento de la aspirina se debe a Arthur Eichengrün. Una prueba adicional de que el mismo se consideraba el autor lo demuestra el hecho de que fue el primero en ensayar el fármaco y su lucha por la comercialización. Es triste el carácter olvidadizo de los logros de sus científicos por algunas empresas y que la manipulación política pueda llegar al extremo de negar el crédito de una invención tan importante como el medicamento más vendido de la historia.

BIBLIOGRAFÍA

(1) QUER, P. F. (2000): Plantas Medicinales. 2.ª Edición. Península, Barcelona.
(2) BROCK, W. H. (1998): Historia de la Química. 1.ª Edición. Alianza Editorial, Madrid.
(3) Biografía de Arthur Eichengrün (2005): www.wikipedia.com.
(4) DRESER, H. (1899): Pharmakologisches uber aspirin (Acetylsalicylsäure). *Pfluger's Arch. Anat. Physiol.* 76: 306-18.
(5) SNEADER, W. (1996): Drug Prototypes and their Explotation. J. Wiley & Sons, Nueva York.
(6) EICHENGRÜN, A. (1949): 50 Jahre Aspirin. *Pharmazie* 4: 582-4.
(7) SNEADER, W. (1999): The RSC Annual Conference, Edinburgh.
(8) TAUBER, S. J. (2005): Carta al Editor. *Chem, Ing. News*. Página 6 del número del 12 de septiembre.

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 861-866

Sesiones

Innovación de medicamentos en un nuevo milenio

ANTONIO MONGE VEGA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Los medicamentos son el bien más querido por la sociedad. Son productos de los que nadie quiere prescindir cuando los necesita. La cuestión que se plantea en este siglo XXI es la de por dónde puede dirigirse la innovación en nuevos compuestos que mejoren los que se están utilizando, a la vez que se encuentran otros para enfermedades no tratadas, en estos momentos. La solución no es fácil y deben considerarse aspectos económicos del desarrollo de la ciencia y también éticos.

En los últimos años del pasado siglo XX, la palabra investigación se entendía por la sociedad como un marchamo de calidad sobre cualquier actividad realizada por el hombre. Poco a poco ha ido imponiéndose otra expresión que completa a la investigación. Nos estamos refiriendo a «Investigación, Desarrollo e Innovación» (I+D+I). Se entiende que las actividades y hallazgos en el campo de la investigación deben terminar en la innovación, como un signo del interés de la investigación. En este año, tan repleto de efemérides, se puede recordar como se insiste en los medios de comunicación que las bombas atómicas sobre Japón de 1945 o la aventura espacial son innovación, consecuencia de la investigación. Sirva también la reflexión anterior para concluir que la investigación puede tener en la innovación consecuencias de muy distinto orden en lo social, económico… y también en lo ético.

Con todo, la actividad humana en la que se reconoce mayor trascendencia innovadora de los resultados de la investigación, se refiere claramente a todo lo relacionado con la salud. La vida es lo más importante que tiene el hombre.

La contribución de los medicamentos para evitar perder la salud, o para recuperarla cuando se pierde, es indiscutible, baste mirar al incremento en la esperanza de vida, en el pasado siglo XX, y a la mejor calidad que tiene el hombre, en estos momentos, en su lucha con la enfermedad y sus secuelas.

Pero este siglo XXI aparece con luces que deslumbran, y con retos que es preciso resolver en el camino hacia delante de nuestra sociedad.

La industria farmacéutica, el gran sector de la I+D+I de los medicamentos, se encuentra perpleja en unos casos, y desorientada en ocasiones, en lo que se relaciona con su actividad a futuro. Algunos de los grandes retos a los que se enfrenta eran previsibles, a la vez que consecuencia de la brillante actividad de la última mitad del siglo XX.

No es posible, en esta reflexión, hacer cosa diferente a señalar, indicar o mostrar algunos retos que deben ser resueltos, en la esperanza de obtener más y mejores medicamentos.

La situación actual está marcada, entre otras cosas, por la caducidad de las patentes en importantes compuestos de un buen número de laboratorios farmacéuticos. El siglo pasado fue el siglo de oro del medicamento. La sociedad pasó de no tener medicamentos para casi nada, a tenerlos para casi todo. Esos productos protegidos por patentes están viendo caducada su exclusividad y, lo que es peor, las compañías farmacéuticas no encuentran, en muchos casos, sustitutos que les permitan mantener la actividad empresarial, y muy especialmente, la investigadora. En diez años, los gastos de investigación se han triplicado, en tanto que el número de nuevas entidades permanece constante.

La innovación farmacéutica está también claramente determinada por las políticas de control de gasto farmacéutico de las sociedades, a la vez que por el muy razonable incremento en costos que garanticen la seguridad. No es cuestión menor la circunstancia de que la empresa farmacéutica se encuentra como en un escaparate en

el que cualquier medio la enjuicia, ensalza o vitupera, de forma que las presiones morales y legales tienen una dimensión especial, muy distinta a la de cualquier otra actividad.

Los avances tecnológicos en el conocimiento de las enfermedades están obligando a estrategias nuevas para mejorar la actividad, que conduzca al objetivo final que es la innovación.

Es de importancia observar la separación entre operaciones químicas y farmacéuticas, a fin de determinar claramente el negocio en cada una de las actividades. Tal es el caso de ICI al segregar las operaciones farmacéuticas en Zeneca. Las técnicas de gestión también han cambiado sustancialmente, de forma que la organización del trabajo se hace en función del proyecto, lo que da una gran flexibilidad a las compañías con la consecuente pérdida de profundidad en el tratamiento de las cosas, así como en el del establecimiento de las líneas científicas. Las actividades de la I+D+I del medicamento ya no pueden hacerse en su totalidad en la compañía y su consecuencia más inmediata es acudir al «outsourcing», de forma que no es descarbable plantear el futuro de la empresa farmacéutica, como el de una oficina desde donde únicamente se concretan actividades que se hacen fuera.

La deslocalización de la información y la facilidad para obtenerla por medios electrónicos está llevando a considerar términos de «benchmarking» o imitación creativa, con pautas nunca antes consideradas. Lo que antes era simplemente copia, ahora se traduce en mejora sobre la base de lo existente.

La consecuencia del panorama que se ha esquematizado se encuentra en que en los próximos años la investigación va a estar muy dirigida a la mejora de los medicamentos existentes, con preferencia a innovaciones netas. Esta mejora es importante cuando el objetivo que se propone así lo es. Tal es el caso de resolver asuntos relacionados con la toxicidad o la biodisponibilidad.

En lo que se refiere a nuevos productos, éstos serán consecuencia del mejor entendimiento de los mecanismos biológicos por los que se produce la actividad, así como por el descubrimiento de nuevas dianas, consecuencia de la información recibida de los avances en la biología molecular.

Un ejemplo muy concreto se puede plantear en el caso de la terapia anticancerosa. Se ha pasado de la primera época, que empieza en los cuarenta del pasado siglo, con los agentes intercalantes de DNA, con las mostazas nitrogenadas, los primeros antimetabolitos... a una segunda época, en que se empiezan a entender las bases moleculares de la enfermedad, permitiendo a los químicos farmacéuticos sentar las bases para un diseño racional de fármacos, en razón de bases estructurales y cuyo reto fundamental se establece en la diferenciación entre células tumorales y normales. La investigación camina hacia una medicina cancerosa, personalizada, que considera las anormalidades moleculares, responsables de la iniciación tumoral y de su progresión. La situación actual es de optimismo, como se plantea en Inglaterra, proponiendo la posibilidad de conquistar el cáncer en dos generaciones (www.cancerresearchuk.org), que de alguna forma coincide con la apreciación de A. C. Von Eschenboch, del NCI en USA, que anuncia su objetivo de eliminar el sufrimiento y la muerte relacionada con el cáncer en los alrededores de 2015 *(Nat. Rev. Cancer,* 2001, 4, 820-828). Aunque, algunas voces son más prudentes, como la de C. Leaf, que publica en *Fortune* (2004, 149.6, 76-78) las razones por las que se ha perdido hasta ahora la batalla sobre el cáncer, a la vez que propone qué se puede hacer para ganarla, en una reflexión, también política, sobre los esfuerzos derivados de la batalla declarada en USA contra esta enfermedad a partir de las propuestas de Richard Nixon en 1971.

Los mensajes que recibe la sociedad respecto a esta enfermedad son positivos. Así, se plantea la Genómica, como la segunda edad de oro en el desarrollo de compuestos con actividad anticancerosa. P. Workman, *Mol. Biosyst.* 2005, 1, 17-26; o como se escribe en *The Economist,* en su editoiral, de 16 de octubre de 2004 (99-101). Beating Cancer: «Aunque no se espera la curación del cáncer, la gente podrá vivir con él, como, por ejemplo, con la diabetes», o como se señala también por C. Leaf en *Fortune,* 2004, 149.6, 76-82: «Por qué hemos pedido la batalla contra el cáncer y qué podemos hacer para vencerla».

Voces muy sensatas como las que se corresponden en USA por el NCI han anunciado su objetivo de «exterminar el sufrimiento y la muerte relacionados con el cáncer para 2015» (A. C. Von Es-

cheboch, *Nat. Rev. Cancer,* 2001, 4, 820-828). En UK consideran la posibilidad de conquistar el cáncer en dos generaciones. www.cancerresearchuk.org.

Es claro que, en estos momentos, para ganar la batalla al cáncer, se confía mucho en la genomica. También en la elucidación de sus bases moleculares.

El primer ataque, fundamentado a la enfermedad, empieza en los cuarenta con el descubrimiento de los primeros agentes intercalantes de DNA, con las mostazas nitrogenadas... La segunda aproximación se basa en el entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad, que permite la creación de una plataforma para el diseño racional de drogas, basadas en un mecanismo de acción, que actúan de forma selectiva sobre células malignas. La actual medicina anticancerosa camina hacia una personalización, consecuencia de interactuar con anormalidades moleculares, responsables de la progresión de los cánceres humanos.

Los periódicos económicos se preocupan de la innovación en medicamentos, tal es el caso de *The Economist,* que en su editorial de 16-10-2004 ofrece el siguiente mensaje a sus lectores: «Aunque no se espera la curación del cáncer, la gente podrá vivir con él de la misma forma que con la diabetes». Nuevamente, la investigación, innovación y el mundo de la empresa se reconocen. Los científicos plantean otra aproximación más acorde con su preparación y actividades. Tal es el caso de P. Workman, afirmando que la genómica será la segunda edad de oro en el desarrollo de compuestos anticancerosos *(Mol. Biosyst.* 2005, 1, 17-26).

Está marcado el terreno, los medios de información tienen material para sus publicaciones, pero los hechos son otros. Los científicos observan cosas, obtienen resultados, los ponen juntos y sacan sus consecuencias. Pues bien, los hechos son que los avances en la innovación, consecuencia de estas aproximaciones, cuando los hay, son más lentos de lo que la sociedad esperaba. Es revelador el trabajo de F. Sams-Dod en un review de *Drug Discovery Today* (10.3, 130-147, 2005), donde se hace la siguiente pregunta: «Target-based drug discovery: is something wrong?» del que transcribo el final de su conclusión:

> The optimal drug discovery strategy is probably impossible to achieve, but it is relatively simple to reach a drug discovery paradigm that integrates rational drug discovery with a strong physiology and disease focus. The paradigm must not be risk aversive, because pharmaceutical R&D is by definition high-risk, but is should balance a high-risk strategy with proper risk and resource management. The paradigm should be data-driven and should favour a «try and learn» approach to produce a high turn-over of projects in the early pipeline, because only by trying can we evaluate a new approach to disease treatment.

El trabajo anterior se puede concluir en tres palabras: «Try and Learn», ni más ni menos que de lo que siempre ha sido y será en las ciencias experimentales y de la vida.

En todo caso, es indudable que las compañías farmacéuticas están invirtiendo de forma decidida en genética, como una forma de encontrar nuevos medicamentos y tratamientos en una medicina personalizada. Tal y como plantea Allen Roses, Vicepresidente de GSK, «the vaste majority of Drugs» more than 90 per cent –only work in 30 or 50 per cent of the people», situación que es sobradamente conocida, por ejemplo, en la terapia antidepresiva que es activa solamente en aproximadamente el 30% de los pacientes. Pero permítase plantear la observación de tipo ético. Si, actualmente, el 90% de los inversiones en investigación se planean en enfermedades que afectan al 10% de la población mundial, cómo variarán estos porcentajes, en base a un tipo de medicina como la que se está proponiendo, que, previsiblemente, tendrá un alto coste, teniendo muy claro el legítimo derecho de las empresas a implicarse en aproximaciones que permitan su subsistencia. La pregunta queda hecha. La sociedad sabrá dar una respuesta positiva, pero bueno es alertar sobre el problema.

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 867-871

Sesiones

Medicamentos del año 2004. Perspectiva histórica de la investigación y el desarrollo

J. PROUS COCHS
Prous Science

En 1987 iniciamos la publicación de una serie de artículos en el primer número anual de la revista *Drug News & Perspectives*, que bajo el título «Medicamentos del Año» (The Year's New Drugs) presentan los medicamentos comercializados por vez primera durante el año anterior. Hemos publicado 17 revisiones anuales, lo cual nos permite hacer un análisis del período comprendido entre 1987 y

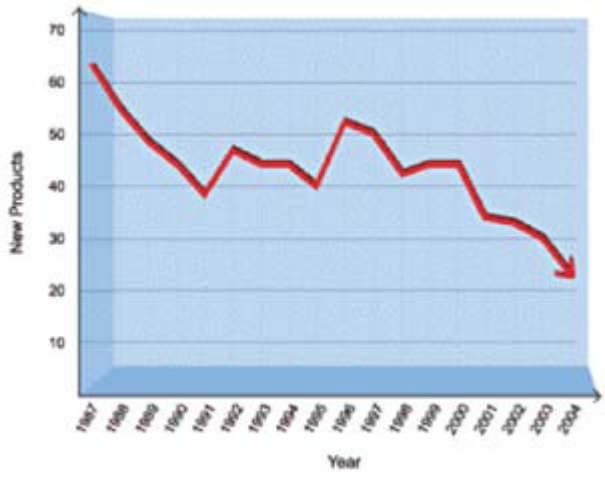


FIGURA 1. *Nuevos productos comercializados (1987-2004).*

2004. Observamos que entre 1987 y 1991 hay un descenso continuado del número de medicamentos comercializados. Debido a una serie de normas dictadas por la FDA americana - PDUFA (*Prescription Drug User Fee Acts*) para acelerar el proceso de aprobación de nuevos fármacos notamos una recuperación de estos productos entre 1992 y 2000. A partir de este año se observa una caída vertiginosa que toca fondo en 2004.

Entre los principales factores que han influido en el descenso de la innovación farmacéutica cabe señalar:

— Elevado coste que supone el desarrollo de un producto hasta su comercialización.

— Expiración de patentes.

— Procesos exigentes y lentos por parte de las autoridades sanitarias para la aprobación de nuevos medicamentos.

— Los riesgos que conlleva la investigación y comercialización de nuevos fármacos. En lugar de sumar, algunas veces debemos restar el número de nuevos fármacos comercializados. De este modo, en el período desde 1987 hasta la fecha se retiraron del mercado 24 productos por razones de seguridad.

— Fusiones y adquisiciones que motivan una disminución del portafolio de productos en fase de investigación.

— Saturación de fármacos en determinadas áreas terapéuticas.

Los esfuerzos de investigación para encontrar nuevos fármacos se centran en las dianas moleculares: receptores, enzimas y canales iónicos. Actualmente se están estudiando unas 350 dianas moleculares en la búsqueda de nuevos mecanismos. Pronto sobrepasarán los 500.

La Tabla adjunta proporciona una lista de los fármacos introducidos por vez primera en 2004 con sus mecanismos de acción e indicaciones.

TABLA 1. *Mecanismo de acción de los 23 fármacos nuevos comercializados en 2004*

FÁRMACO	MECANISMO	INDICACIÓN
Abarelix*	Antagonista de la hormona de liberación de la gonadotropina (GnRH)	Cáncer de próstata
Azacitidina	Inhibidor de la ADN metiltransferasa	Síndromes mielodisplásicos
Belotecán HCI	Inhibidor de la topoisomerasa I	Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)
Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal, inhibidor de la angiogénesis	Cáncer de colon, cáncer de recto
Cinacalcet HCI	Calcimimético	Hiperparatiroidismo secundario
Duloxetina HCI	Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina	• Dolor neuropático periférico en diabéticos • Trastornos depresivos mayores • Incontinencia urinaria
Erlotinib HCI	Inhibidor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR)	Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)
Everolimús	Inmunosupresor, inhibidor mTOR	Profilaxis del rechazo en el trasplante de riñón
Fosfluconazol	Antifúngico	Peritonitis de origen fúngico
Gadoxato disódico	Medio de contraste	Diagnóstico de trastornos hepatobiliares
Indisetrón HCI	Antagonista 5-HT_3/HT_4	Náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia
Insulina detemir	Análogo de la insulina de acción prolongada	Diabetes tipo 1 y tipo 2
Mitiglinida cálcica H2O	Inhibidor de la α-glucosidasa	Diabetes tipo 2
Natalizumab**	Anticuerpo monoclonal anti-CD49d	Esclerosis múltiple
Pemetrexed disódico	Antifolato multidiana, inhibidor de la timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa y glicinamida ribonucleótido formiltransferasa	• Mesotelioma pleural maligno • Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)
Pregabalina	Análogo del ácido gamma-aminobutírico (GABA) que se une a los canales de calcio dependientes del voltaje en el SNC	• Dolor neuroléptico • Epilepsia

TABLA 1. *Mecanismo de acción de los 23 fármacos nuevos comercializados en 2004* (Cont.)

FÁRMACO	MECANISMO	INDICACIÓN
Ranelato de estroncio	Fármaco con actividad osteoformadora antirresortiva	Osteoporosis postmenopáusica
Secretina humana	Hormona	Ayuda en el diagnóstico de la disfunción pancreática exocrina
Succinato de solifenacina	Antagonista muscarínico M3	Incontinencia urinaria
Talaporfina sódica	Terapia fotodinámica	Carcinoma endobronquial
Tecnecio [99mTc] fanolesomab	Anticuerpo monoclonal, anti-CD15 marcado con tecnecio	Diagnóstico de apendicitis
Vacuna frente al meningococo serogrupo B	Vacuna	Prevención de enfermedades producidas por el meningococo serogrupo B (P1.7-2,4 cepa Nueva Zelanda)
Ximelagatrán	Inhibidor de la trombina	Prevención de eventos trombóticos

* Retirado del mercado en 2005 por razones comerciales.
** Retirado del mercado en 2005 por razones de seguridad.

La distribución geográfica de los nuevos productos comercializados en 2004 se muestra en la Figura 2. Siguiendo una tendencia ya establecida hace muchos años, el mayor número de productos nuevos fueron comercializados en EE.UU. (43% del total).

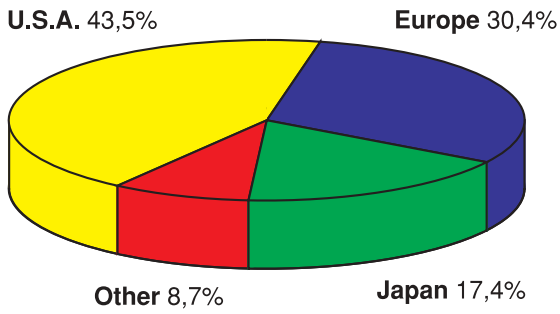


FIGURA 2. *Distribución geográfica de los nuevos productos comercializados en 2004.*

A pesar de los desafíos a los que se enfrenta la industria farmacéutica, en la actualidad debemos mirar al futuro con esperanza.

La extraordinaria evolución del conocimiento biomédico abre camino a importantes adelantos en el diagnóstico, el tratamiento y la seguridad de los fármacos. La colaboración entre la universidad y la industria, así como el nacimiento de pequeñas empresas generadoras de conocimiento, ayudarán en este sentido.

La necesidad de medicamentos crece ampliamente a medida que las expectativas de vida se alargan.

Las naciones pobres serán más ricas; un fenómeno relacionado es la inmigración.

Se gastará más en medicinas, ahorrando los costes de hospitalización y cirugía.

El desarrollo de nuevos fármacos es un componente crucial en las esperanzas para conseguir una vida mucho más sana. Todos los que estamos involucrados en I+D+I debemos trabajar bajo este lema.

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 873-904

Sesiones

La innovación farmacéutica. Comentarios sobre tres noticias

CARMEN AVENDAÑO
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Esta contribución es la continuación de una iniciativa de la Real Academia de Farmacia para contemplar y comentar el avance (I+D+i) del mundo de los fármacos y medicamentos. Esta iniciativa comenzó el año 2004 con la publicación de una monografía en la que participé como coeditora, a la vez que autora de un capítulo de carácter general. En él reflejé cómo veía el camino de la investigación y del desarrollo de fármacos desde distintas perspectivas (1). Con anterioridad, y dentro del ciclo de conferencias del Instituo de España «Anticipaciones Académicas del siglo XXI», había reflexionado sobre «El futuro de los medicamentos» (2). Tengo que advertir que contemplo la investigación farmacéutica con la visión parcial que supone mi trabajo profesional, por tanto, las noticias que a mí me parecen importantes no tienen por qué ser las de mayor interés general.

En esta ocasión he seleccionado algunos de los muchos acontecimientos que han sucedido a lo largo del curso 2004-2005 en relación con estos temas. Me voy a limitar a tres hechos que me han parecido relevantes. Por una parte, el déficit manifiesto de innovación y productividad en España. Por otra, la duda que puede plantearse, tras la retirada de rofecoxib, acerca del paradigma de que los fármacos de diseño de acción selectiva son los que poseen mínimos efectos secundarios. Las agencias gubernamentales que han de aprobar un nuevo medicamento tienen que analizar una información que suele contener una media de 50.000 páginas y, además, están sujetas a presiones desde las cada día más activas asociaciones de enfermos,

así como de economistas y de políticos. Una decisión negativa puede afectar al empleo de miles de trabajadores muy cualificados, mientras que la aprobación de un fármaco que acaba produciendo efectos secundarios adversos puede levantar un gran revuelo social y conducir al establecimiento de controles todavía más estrictos.

Finalmente, me ha parecido relevante como ejemplo de interacción para el desarrollo de nuevos fármacos entre la sociedad, la economía, la biotecnología y la química, la apertura de una nueva vía para la síntesis del antimalárico artemisinina y de sus derivados. La industria farmacéutica ha de satisfacer a los inversores que la sostienen y, en consecuencia, dirigirse a desarrollos que sean rentables. Tiene además un frente de batalla cada vez más amplio, que es la competencia del mercado de los genéricos. El abandono del abordaje de tratamientos de enfermedades del mundo no desarrollado, así como el alto precio de los nuevos medicamentos, están siendo también muy cuestionados.

1. LA INNOVACIÓN EN ESPAÑA: UN PROBLEMA DE INVERSIÓN, EDUCACIÓN Y CREATIVIDAD

La necesidad de mejorar la capacidad española para innovar científica y tecnológicamente es algo que nadie discute. La imitación conduce a mejorar la eficiencia, a reducir los precios y a incorporar tecnologías y modos de gestión, pero la innovación es imprescindible para el crecimiento de la empresa y su productividad. Los políticos han de facilitar más el desarrollo de proyectos y la creación de empresas, ayudando a éstas a encontrar financiación privada. La sociedad debe ser consciente de las ventajas de la tecnología, y la universidad y la empresa deben estrechar su relación.

Según el Banco de España, sólo el 32,6% de las empresas españolas (tres de cada diez) dedica recursos a la innovación, mientras que en la UE la media se encuentra en el 44,4%. Además, lo que se dedica a estas actividades muchas veces no se utiliza de la forma más eficiente.

Uno de los mayores expertos en políticas de innovación, Nathan Rosenberg, advertía recientemente a los políticos, empresarios y tra-

bajadores españoles lo siguiente: «Ustedes tendrán que cambiar de dirección. No podrán explotar nunca más la mano de obra barata, porque ya no lo es. Si no desarrollan nuevos productos, y los incorporan después a sus procesos industriales, van a tener problemas. Van a sufrir». Además de todo esto, es imprecindible el desarrollo de una educación superior de calidad: «Para que un país desarrolle tecnologías complejas, necesita tener gente con capacidades complejas».

1.1. Inversión

La estrategia de Lisboa marcó como objetivo elevar al 3% el porcentaje del PIB a la inversión en I+D, pero en España esta inversión se encuentra en torno al 1% del PIB. No puede sorprender a nadie que en una evaluación reciente de indicadores de competitividad, nuestro país ocupe el puesto 38 del ranking internacional. La cambiante política de precios de los medicamentos contribuye a que la investigación farmacéutica en España se contemple con especial preocupación.

1.2. Educación

Mientras que Estados Unidos invierte un 2,3% de su PIB en educación superior, la media de toda la UE ronda el 1,3%. El último informe académico de la Universidad Jiao Tong de Shanghai, que evalúa la actividad académica e investigadora a partir de un conjunto de indicadores basados en la investigación y la actividad académica de cada facultad, la mejor universidad española se encuentra en el puesto 170 dentro de las 500 mejores del mundo. Está más que claro que, tanto los políticos como los profesores, deben reconocer esta situación e intentar superarla.

1.3. Creatividad

La ciencia española ha progresado mucho en los últimos veinte años, ocupando el número 12 del ranking de naciones en cuanto a la producción de artículos científicos de alto impacto, con un 2% del

total mundial (3). Sin embargo, el sistema de investigación pública admite muchas mejoras, empezando por la optimización de los sistemas de convocatorias y selección de proyectos, que deberían tender ante todo a la más correcta asignación de recursos superando los conflictos de intereses. La situación es mucho más precaria en la industria. La de la industria farmacéutica, en especial, es preocupante actualmente al verse directamente afectada por los recortes en los precios de los medicamentos.

2. EL PARADIGMA DE LA SELECTIVIDAD DE ACCIÓN ¿SON LOS FÁRMACOS DE DISEÑO DE ACCIÓN SELECTIVA LOS QUE POSEEN MÍNIMOS EFECTOS SECUNDARIOS?

En los últimos tiempos se está ampliando el papel de la fase IV como medio para detectar efectos secundarios que hayan pasado inadvertidos en las fases I-III, especialmente en lo que se refiere a efectos de tratamientos a largo plazo y a las interacciones entre distintos fármacos. Esta filosofía tiene dos efectos opuestos. Por una parte, aumenta la seguridad de los medicamentos, pero por otra aumenta la inversión y el riesgo de su desarrollo y, por lo tanto, el coste final. Muchos de estos efectos podrían superarse con un mayor conocimiento previo, en el que la química también desempeña su papel.

2.1. El problema de los inhibidores de COX-2

El desarrollo de inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducible ha sido uno de los mayores avances en el tratamiento del dolor y la inflamación en procesos como la osteoartritis, sin que ocurra la erosión gástrica que originan los viejos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs o NSAIDs) (4, 5). Aspirina, indometacina, ibuprofeno y naproxeno, por ejemplo, inhiben dicha enzima, pero también inhiben la COX-1, otra isoenzima que cataliza la formación del citoprotector PGE_2 en la mucosa gástrica. La retirada en septiembre del 2004 del inhibidor de COX-2 rofecoxib (Vioxx® de Merck) ha supuesto un derrumbe del precio de las acciones de la compañía Merck, no sólo por la pérdida de ventas (sólo en Estados Unidos había 30 millones de consumidores), sino por las indemniza-

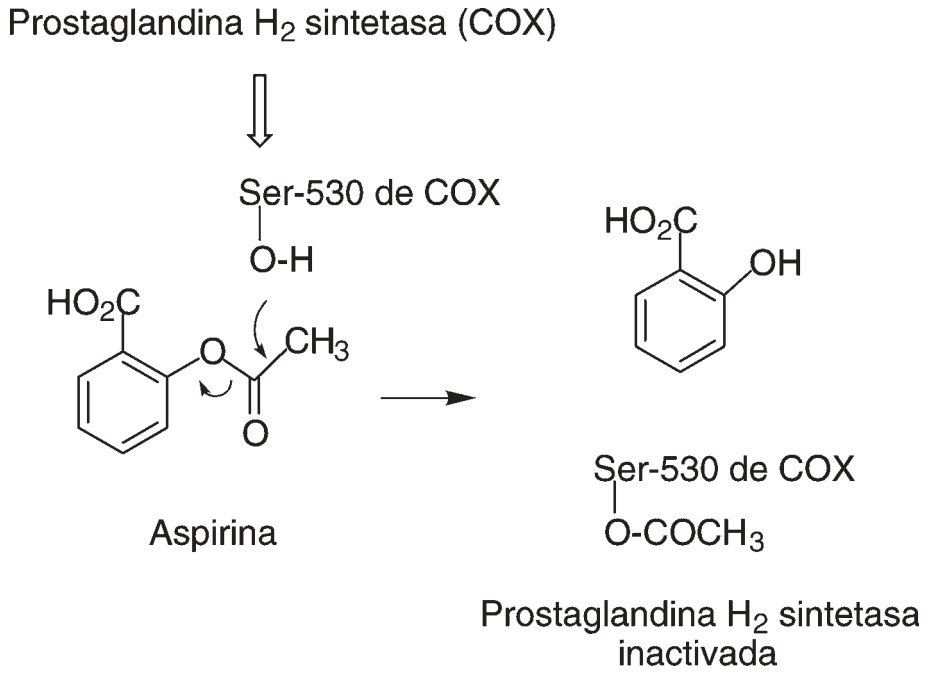
ciones previsibles y por la desconfianza que se ha generado hacia la empresa. Además, debido a la atribución del riesgo al propio mecanismo de acción de los inhibidores COX-2 selectivos, más que a un fármaco específico, todos los inhibidores COX-2 han pasado a ser sospechosos (6).

Estamos, por tanto, ante dos importantes cuestiones: 1) ¿La eterna búsqueda de la selectividad de acción en los fármacos puede no ser correcta? Recordemos que los inhibidores COX-2 fueron concebidos como «fármacos de diseño» dentro del grupo de antiinflamatorios no esteroideos, en un intento deliberado de superar la mayor limitación de los antiinflamatorios tradicionales, concretamente la irritación de estómago debida a la inhibición de la isoforma COX-1. 2) ¿Qué ocurre con los demás inhibidores COX-2 selectivos que no se han retirado? En este análisis he incluido a la aspirina y al paracetamol por sus especiales características.

2.2. Aspirina

La corteza y las hojas de sauce se utilizaron durante siglos para aliviar el dolor. Entre 1820 y 1830 se aisló su principio activo, la salicinina, un glucósido del alcohol salicílico que por su acidez en agua se denominó ácido salicílico. Este producto se aisló también en 1839 de las flores de ulmaria (*spiraea ulmaria*). Posteriormente se encontró que el salicilato de metilo (aceite de Wintergreen) tenía la misma actividad. El ácido salicílico se hizo accesible industrialmente a partir del alquitrán de hulla, pero por su mal sabor y la irritación de estómago que producía podía aplicársele la frase: «era peor el remedio que la enfermedad». En 1897 Felix Hoffman, que había diacetilado la morfina para producir en la industria alemana Bayer la heroína (considerada entonces no adictiva), sintetizó la aspirina por acetilación del grupo hidroxilo del ácido salicílico. Este compuesto había sido sintetizado previamente de forma más o menos pura, pero no se había reparado en su potencial médico. Los resultados que se obtuvieron en algunos ensayos clínicos motivaron que se introdujera en el mercado como analgésico en 1899 con el nombre de *aspirin* («a» por acetil, «spir» por la flor *spiraea*, siendo «in» un sufijo que se utilizaba frecuentemente para los fármacos). A partir

de entonces se utiliza junto con otros AINEs como antiinflamatorio en los procesos reumáticos (7). Su principal mecanismo de acción fue determinado por Sir John Vane en 1971 (que obuvo el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1982 y el título de Sir), al observar que inhibe la síntesis de prostaglandinas (8). La racionalización de este mecanismo, en función de la estructura, se confirmó en 1995 sobre la base de la estructura cristalina de la COX, también denominada prostaglandina H_2 sintetasa (Esquema 1) (9).



ESQUEMA 1

2.3. AINEs

El principal efecto secundario de estos fármacos es su toxicidad gastrointestinal, debido a la erosión que producen en la mucosa, lo que supone un riesgo para la salud (10) y, además, un alto coste económico (11). Algunos antiinflamatorios «clásicos», como el me-

loxicam, tienen menores efectos gástricos, y esto se debe a su selectividad de acción ya que produce mayor inhibición de la isoforma COX-2 (Tabla 1).

TABLA 1. *Actividad inhibidora COX-2/COX-1 de AINEs «clásicos»*

AINE	COX-2 CI_{50} µmol/l	COX-1 CI_{50} µmol/l	COX-2/COX-1
Meloxicam	0,0019	0,0057	0,33
Diclofenaco	0,0019	0,000855	2,2
Piroxicam	0,175	0,00527	33
Tenoxicam	0,322	0,201	15
Indometacina	0,00636	0,00021	30
Tenidap	47,8	0,393	122

Como puede verse en la Figura 1, la COX-2 está implicada en la biosíntesis de prostaciclina, un agente dilatador del endotelio vascular que previene la trombosis y la proliferación de las células del músculo liso, mientras que la COX-1 es necesaria para la biosíntesis de tromboxano en las plaquetas, lo que produce efectos opuestos: agregación plaquetaria y proliferación de las células del músculo liso.

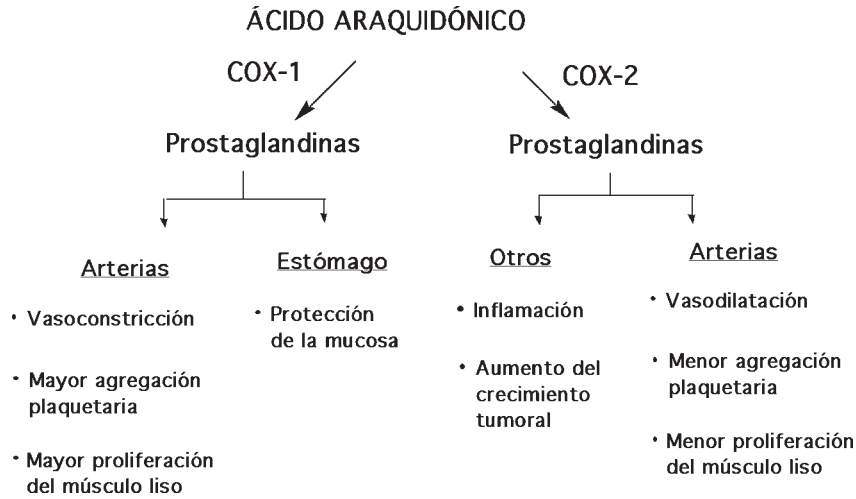


FIGURA 1. *Efectos de las isoenzimas COX-1 y COX-2.*

La aspirina se utiliza actualmente por inhibir COX-1 en la prevención y tratamiento de infartos de miocardio, pero los inhibidores selectivos COX-2 pueden tener un riesgo potencial, ya que al bloquear los efectos beneficiosos de la prostaciclina y mantenerse la producción de tromboxano pueden aumentar la presión sanguínea y el riesgo de trombosis.

La COX se consideró en un principio una enzima de expresión estable, por lo cual, la biosíntesis de prostaglandinas era dependiente sólo de la disponibilidad de su sustrato: el ácido araquidónico. Posteriormente se encontró que COX podía estimularse o inhibirse por varios compuestos químicos, y que en el tejido sinovial de animales y pacientes con artritis sus niveles estaban aumentados. En 1989 se descubrió que la IL-1 induce una mayor actividad COX en los fibroblastos (12), en 1990 que la actividad COX inducible (pero no la basal) es inhibida por esteroides (13), y en 1991 se clonó la COX inducible (14), observándose un 60% de identidad entre ambas pero importantes diferencias en varios aminoácidos. También se confirmó su inducción por citoquinas y factores de crecimiento como TNF, y su regulación por esteroides y otros factores (glucocorticoides e IL-4 la inhiben). La inducción de COX-2 produce fiebre, inflamación y dolor. También parece establecida su implicación en otros procesos como el cáncer (especialmente de colon) o el Alzheimer. Los primeros efectos se deben a que las prostaglandinas actúan sinérgicamente con varios mediadores de la inflamación, como son la bradiquinina y la histamina.

La hipótesis de trabajo al descubrir ambas isoenzimas fue: inhibir la COX basal, que tiene una acción homeostática, es perjudicial; mientras que inhibir la inducible es deseable (15, 16). Como era de esperar, desde un primer momento se observó que la toxicidad gastrointestinal de los inhibidores de COX es menor cuanto mayor es su selectividad hacia la isoforma COX-2 (Figura 2). En contraste con los AINEs tradicionales, los nuevos COXIBs («COX inhibitors») no tienen toxicidad gástrica por inhibir selectivamente la isoforma COX-2.

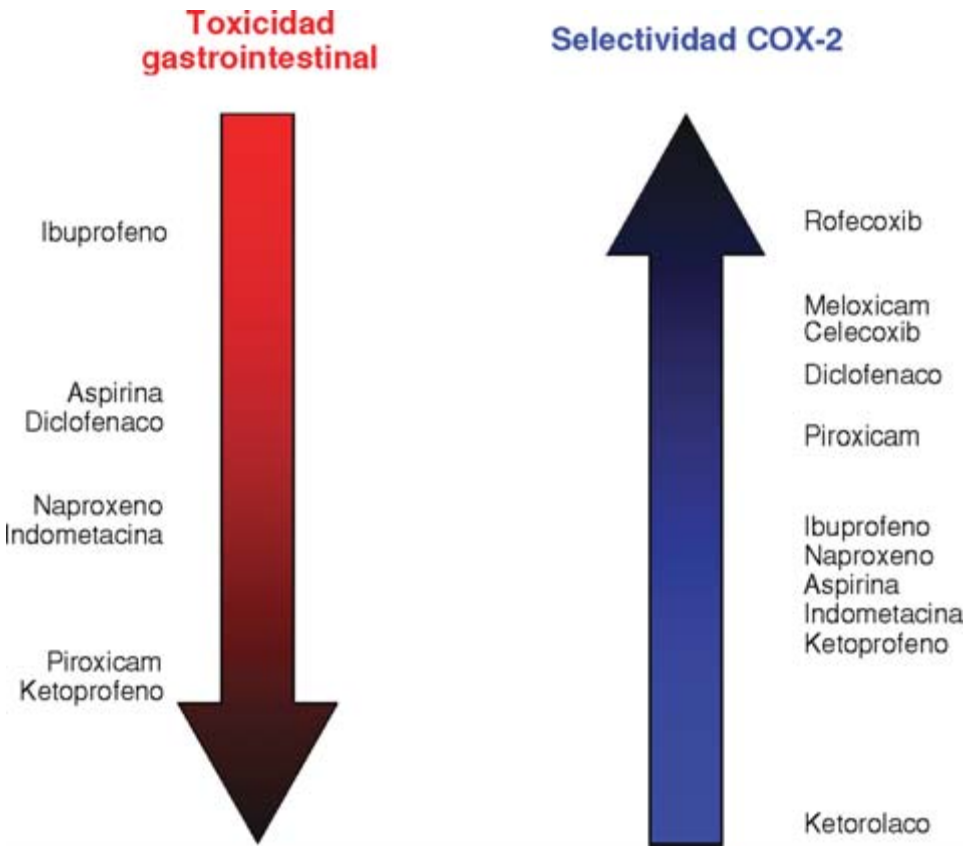
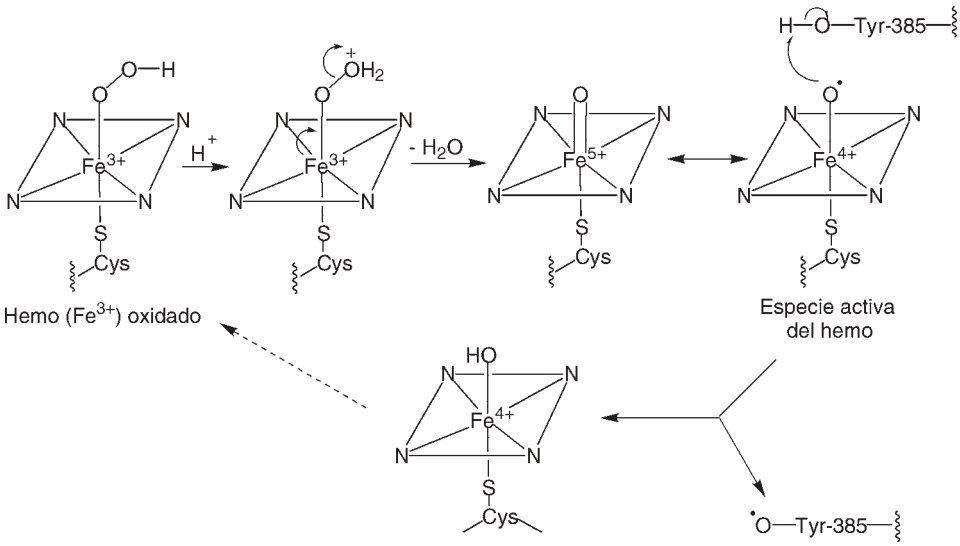


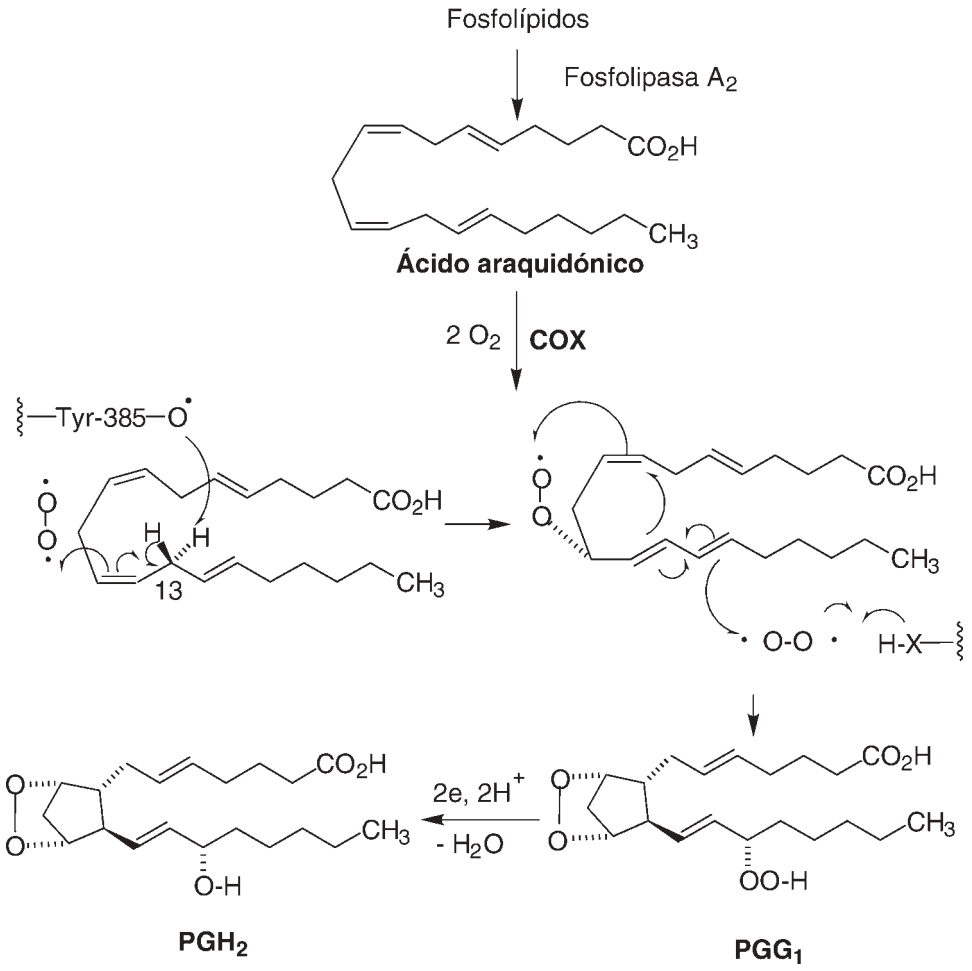
FIGURA 2. *Los efectos gastrointestinales y la selectividad COX-2.*

¿Cómo funciona la COX a nivel molecular? La prostaglandina H sintetasa es una enzima bifuncional, con actividad de ciclooxigenasa y de peroxidasa, que contiene un grupo hemo (una porfirina que contiene Fe^{3+} (17) y cataliza la conversión del ácido araquidónico (o su 5,6-dihidroderivado) en prostaglandina G (PGG_2 o PGG_1 si se trata del derivado dihidrogenado). El ácido araquidónico procede de la hidrólisis de los fosfolípidos constituyentes de las membranas biológicas. Las enzimas que poseen un grupo hemo como cofactor pueden abstraer un átomo de hidrógeno de un sustrato y generar un radical cuando aquel se encuentra en su forma reactiva de un radical oxigenado de Fe^{4+} (Esquema 2).



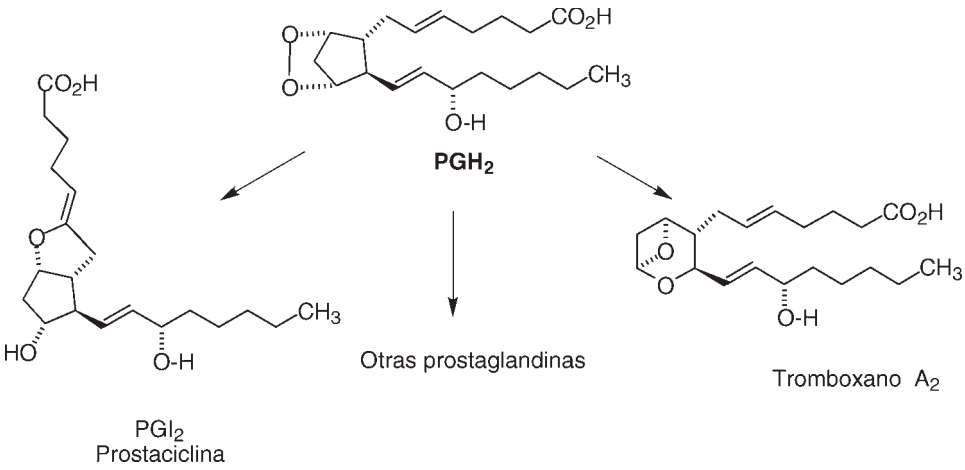
ESQUEMA 2

La especie radicálica oxigenada de Fe^{4+} abstrae primero un átomo de hidrógeno del residuo Tyr-385 de la enzima, este radical abstrae a continuación el átomo de hidrógeno *pro-S* del C-13 del sustrato (18), y el radical así formado, altamente estabilizado por resonancia, tiene una vida suficientemente alta como para iniciar una reacción con oxígeno triplete, seguida de ciclación y adición de otra molécula de oxígeno triplete. Así se forma la prostaglandina G_2 (PGG_2), un hidroperóxido que por la actividad peroxidásica de la enzima acepta dos electrones y dos protones para dar agua y PGH_2 (19). El radical de tirosina se regenera en cada ciclo de ciclooxigenasa y el ferri-oxo-hemo se reduce al estado férrico por reductores endógenos (Esquema 3) (20).



ESQUEMA 3

La PGH_2 se transforma en diversos productos como PGI_2 (prostaciclina) y tromboxano A_2 a través de reacciones catalizadas por otras prostaglandina sintetasas (Esquema 4).



ESQUEMA 4

La estructura primaria de COX-2 se estableció en 1988. Esta enzima está compuesta por 600 aminoácidos, de los cuales algunos son muy importantes para explicar la selectividad de los inhibidores (21).

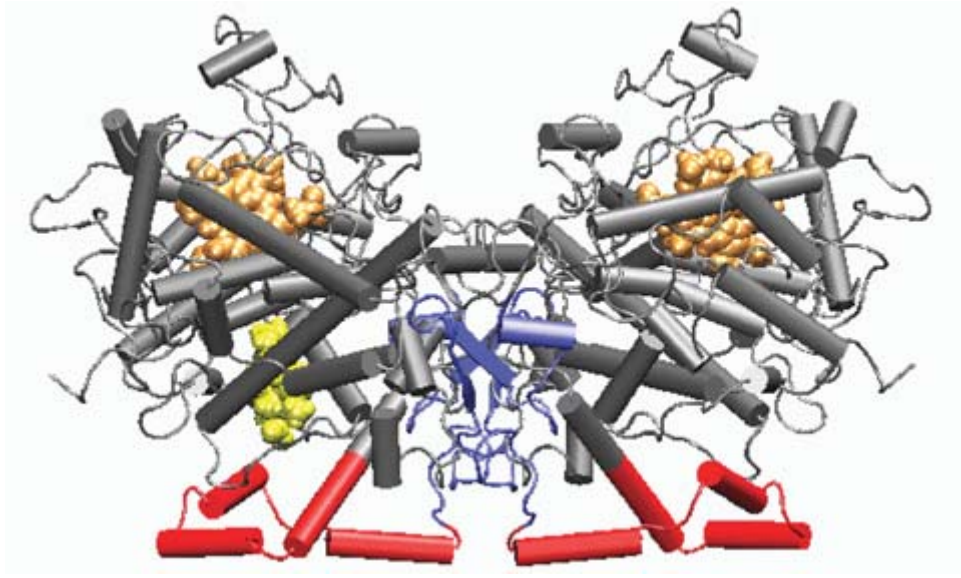


FIGURA 3. *Estructura terciaria del homodímero de prostaglandina H_2 sintetasa.*

En 1994 se publicó la estructura secundaria a través de su estudio con Rayos X. Dicha estructura se caracteriza por una gran cantidad de hélices α y una cantidad muy pequeña de láminas β (22). En cuanto a la estructura terciaria, se trata de un homodímero que se une al sustrato según el modelo establecido por simulaciones de dinámica molecular que se indica en la Figura 3 (23, 24).

En la Figura 4 se esquematiza cómo la enzima COX, representada como monómero aunque es un dímero, se ancla a las membranas celulares introduciendo varios de sus aminoácidos hidrófobos entre las cadenas de ácidos grasos de éstas.

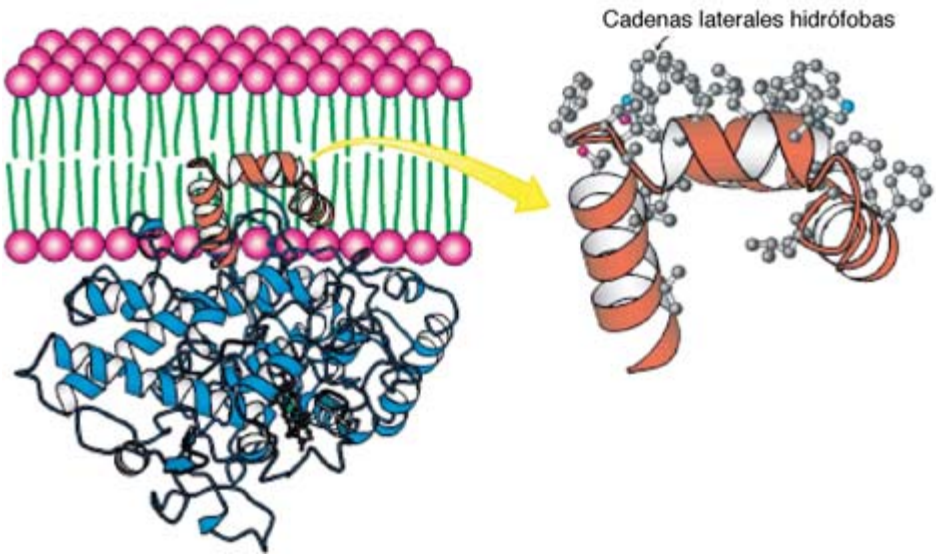


FIGURA 4. *La ciclooxigenasa unida a la membrana.*

Las analogías y diferencias entre las isoformas 1 y 2 se representan en la Figura 5. En el apartado (a) se indica cómo el ácido araquidónico penetra en el sitio activo de ambas, un canal largo y estrecho con gran número de aminoácidos hidrófobos que pueden interaccionar con el sustrato. También se indica su transformación a PGH_2, en la que la porción ciclopentánica se representa con un anillo. En el apartado (b) puede verse que la principal diferencia entre COX-1 y

COX-2 radica en el residuo 523, que es isoleucina en COX-1 y valina en COX-2. Debido al menor tamaño de la cadena de valina respecto a la de isoleucina, la COX-2 presenta un bolsillo en dicho lugar, lo que ha permitido diseñar inhibidores COX-2 selectivos introduciendo un sustituyente voluminoso que pueda acoplarse selectivamente a él y no al centro activo de COX-1. En el apartado (c) se representa cómo los antiinflamatorios no esteroideos se enlazan a ambas isoformas bloqueando la entrada del ácido araquidónico, mientras que en el apartado (d) se representa un inhibidor COX-2 selectivo enlazado al bolsillo mencionado anteriormente mientras que no puede enlazarse al sitio activo de COX-1 carente de dicho bolsillo.

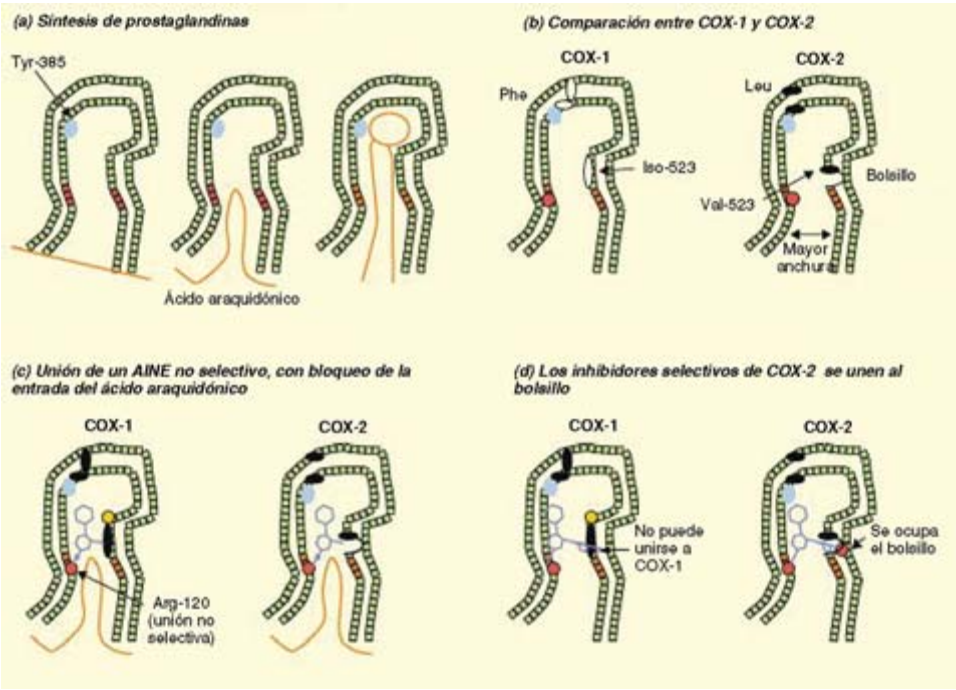


FIGURA 5. *Comparación entre las dos isoformas de COX.*

En el caso de la aspirina, la acetilación de la serina 530 evita que el ácido araquidónico se enlace adecuadamente al sitio activo de la COX-1, mientras que en la COX-2, dado que hay más hueco, tiene

lugar la abstracción de hidrógeno del ácido araquidónico, pero la ciclación de su radical y la formación del endoperóxido no ocurre, produciéndose ácido 15*R*-hidroxieicosatetraenoico en vez de PGH_2.

Algunos inhibidores COX-2 selectivos se indican en la Figura 6. Celecoxib, por ejemplo, es 375 veces más selectivo para COX-2 que para COX-1, de tal forma que no inhibe COX-1 a las dosis terapéuticas.

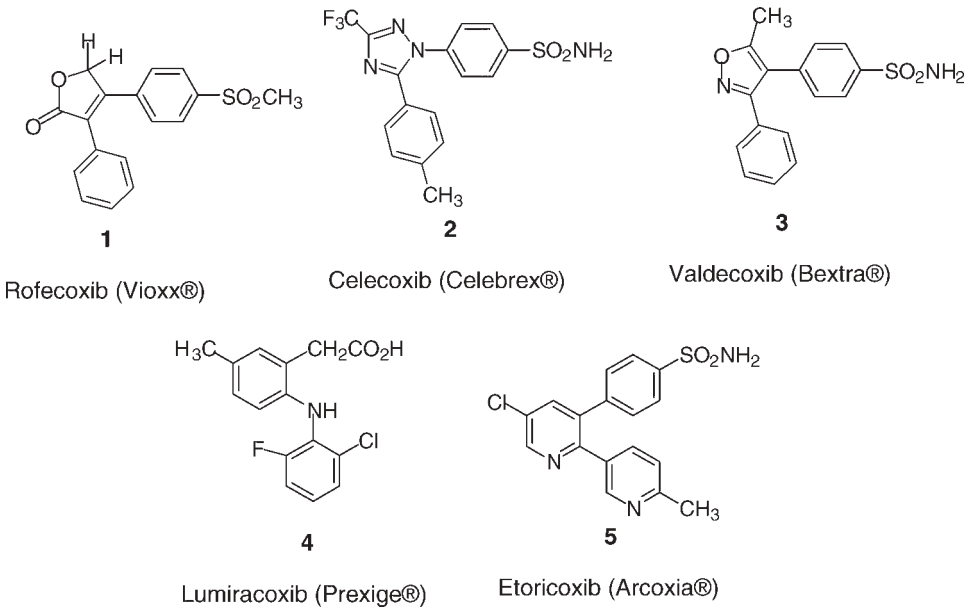


FIGURA 6. *Inhibidores COX-2 selectivos.*

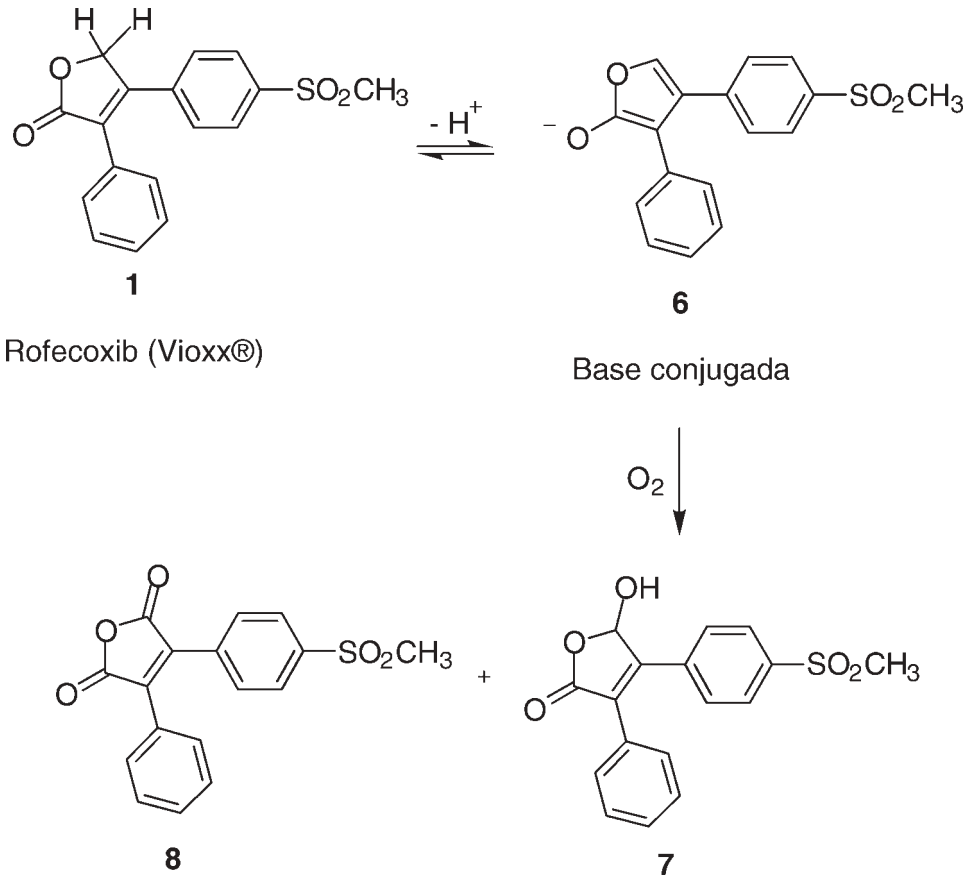
Como ya se ha comentado, el aumento de problemas cardiovasculares en pacientes que poseían este riesgo cuando eran tratados con rofecoxib (25) terminó con su retirada del mercado en septiembre de 2004. La FDA evaluó primeramente si los riesgos de enfermedad cardiaca coronaria se incrementaban con dosis estándar o altas, en comparación con otro fármaco de su misma familia, el celecoxib (Celebrex® de Pfizer), y con otros antiinflamatorios no esteroideos clásicos. Se estudiaron 1,4 millones de personas que habían tomado antiinflamatorios no esteroideos desde comienzos de 1999 hasta

septiembre de 2004, y se observó que 8.143 habían sufrido enfermedades cardiacas coronarias graves que culminaron en 1.508 casos de muerte súbita, siendo evidente que las que tomaron rofecoxib sufrieron en mayor número estos episodios.

2.4. Hipótesis de Corey

Los químicos decimos que «todo está en la estructura». Pues bien, aunque entre los inhibidores COX-2 selectivos pueden observarse claras analogías estructurales, existen diferencias suficientemente significativas como para hacer inaceptable la identidad que se les da en la bibliografía. Recientemente E. J. Corey, premio Nobel de Química de 1990 por sus brillantes trabajos en síntesis orgánica, ha establecido una hipótesis bastante convincente para señalar las diferencias entre rofecoxib y otros inhibidores de COX-2 selectivos (26). El rofecoxib posee un anillo de γ-lactona insaturada denominado butenolida, en el que los átomos de hidrógeno en posición γ respecto al grupo carbonilo son relativamente ácidos (pKa ≈ 12). Esta acidez se debe al efecto atrayente de electrones del grupo carbonilo, que se transmite a través del doble enlace conjugado, y a la aromaticidad del anión (Esquema 5). Como es habitual en muchos aniones orgánicos, la base conjugada de rofecoxib (**6**) es muy reactiva frente al oxígeno atmosférico. De hecho, cuando este anión se genera en el laboratorio por tratamiento con una base fuerte (*n*-BuLi en THF), el color intenso característico de la estructura **6**, altamente resonante, se transforma a los pocos minutos en una coloración marrón-amarillenta, incluso a 0° C. En esta transformación se obtiene una mezcla de productos de oxidación entre los que se encuentra una pequeña cantidad de la γ-hidroxibutanolida **7**, que es un metabolito de rofecoxib (27) y el derivado de anhídrido maleico **8** (28), que es el compuesto mayoritario.

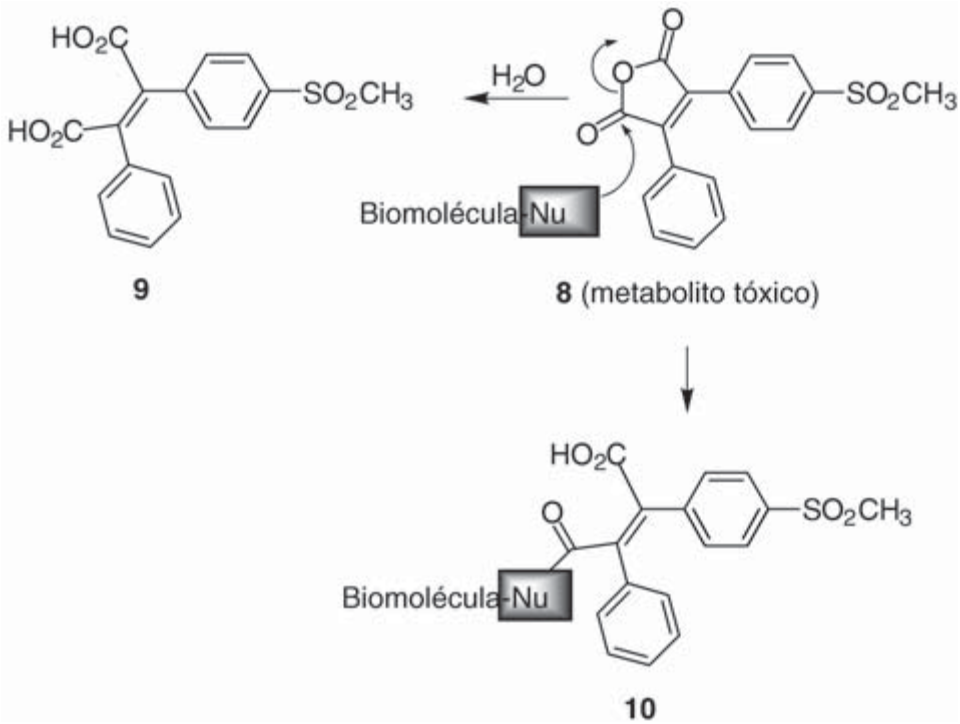
Rofecoxib se transforma también en los compuestos **7** y **8** cuando se agita al aire y a temperatura ambiente una solución en H_2O-THF a la que se ha añadido 1 equivalente de hidróxido de litio, sólo que en estas condiciones, el compuesto **7** se hidroliza para dar un derivado del ácido maleico (**9**). Por otra parte, el O_2 del aire oxida las soluciones de rofecoxib en acetato de etilo a temperatura ambiente, produciéndose hasta un 92% de la γ-hidroxibutanolida **7** en presen-



ESQUEMA 5. *Oxidación de rofecoxib que origina metabolitos tóxicos.*

cia de carbón vegetal (29). Dado que en condiciones fisiológicas rofecoxib está en equilibrio con pequeñas cantidades de su base conjugada, y ésta es tan fácilmente oxidable, puede darse una oxidación espontánea tanto en sangre como en los tejidos oxigenados y pueden producirse *in vivo* pequeñas cantidades del anhídrido maleico **8**. Éste puede hidrolizarse espontáneamente a ácido maleico (**9**), pero pequeñas cantidades pueden tener una vida media suficiente como para ser atacadas por grupos nucleófilos, en especial grupos amino de biomoléculas, para dar los aductos **10** (Esquema 6). Si esto es así, podría explicarse que este fármaco tuviera una toxicidad crónica acumulativa, que podría ser peligrosa después de varios

meses. De hecho, la toxicidad cardiovascular se observa a los 6-18 meses de tratamiento (30).



ESQUEMA 6. *Posible toxicidad del metabolito de rofecoxib* ***8***.

Dicen los farmacólogos que *in vivo, veritas*. Pues bien, los estudios en los que rofecoxib marcado con ^{14}C se administró oralmente (125 mg) a individuos sanos, mostraron que el 71,5% de la radioactividad se recobraba en la orina y el 14,2% en las heces. Es posible por tanto, que el 14,3% restante que no se ha recuperado ni en orina ni en heces, permanezca en el organismo unido covalentemente a biomoléculas durante un período de tiempo más largo. Si esta teoría es cierta, supondría que los restantes miembros de la familia de inhibidores selectivos COX-2, incapaces de originar metabolitos electrófilos por oxidación, sólo tendrían el inconveniente relacionado con su propio mecanismo de acción selectiva, que puede hacerlos desaconsejables en pacientes con riesgo cardiovascular, pero que

podrían seguir utilizándose en un gran número de enfermos que padecen artritis y otras patologías (31).

La preocupación que genera entre algunos científicos la valoración de los riesgos asociados con los inhibidores COX-2 como un todo, se refleja en las palabras de Matt Breyer, catedrático de Medicina en la Universidad Vanderbilt: *In light of the Vioxx withdrawal and the public outcry, I expect there will be fewer dollars available to do the research that we need to do to find out how these- and other-drugs work*. De hecho, en diciembre de 2004 el NCI (National Cancer Institute de EE.UU.) abortó un ensayo para estudiar la eficacia de Celebrex para impedir el crecimiento de pólipos de colon que iba a estudiarse en 2.000 pacientes, y también se ha parado un ensayo en el que se iban a ensayar Celebrex y naproxeno en pacientes de Alzheimer.

Para muchos científicos debería ponerse en marcha inmediatamente un estudio en pacientes que han tomado Vioxx u otros inhibidores COX-2 durante largos períodos de tiempo, y comparar las secuencias genéticas de los que han sufrido accidentes trombóticos con las de aquéllos que no los han padecido, a fin de identificar los polimorfismos de un único nucleótido. Esta relación farmacoterapia-genómica daría las claves para decidir el futuro de este grupo de fármacos.

2.5. El problema del mecanismo de acción del paracetamol y una posible COX-3

El paracetamol se agrupa con los antiinflamatorios no esteroideos, a pesar de que su actividad antiinflamatoria es muy pequeña, porque es un analgésico y antipirético muy popular. En 1972 se demostró que inhibía la actividad COX en determinadas muestras biológicas, lo que sugería que había variantes de estas enzimas que poseían diferente sensibilidad hacia este fármaco, y que éste tenía una acción central (32). Sin embargo, no parecía que las dos isoformas COX conocidas fueran el lugar de acción del paracetamol, ya que ni COX-1 ni COX-2 son sensibles a concentraciones terapéuticas y, paradójicamente, ambas isoformas se activan con pequeñas cantidades de este fármaco. En el año 2002 se publicó un célebre tra-

bajo que proponía cuál era su diana y, posiblemente, la de las pirazolonas y otros compuestos relacionados. Según éste, se trata de una variante de la COX-1 que se denominó COX-3 (también citocromo C oxidasa polipéptido III) y que se expresa en regiones específicas del cerebro de perros, en particular, en el córtex cerebral (33). Esta isoforma está implicada en la síntesis de prostaglandinas, en el dolor y en la fiebre, pero no parece jugar un papel en la inflamación. Los mismos autores descubrieron otras dos variantes de COX-1 que no están implicadas en la biosíntesis de prostaglandinas: PCOX-1a y PCOX-1b («partial» COX). Sin embargo, este trabajo ha sido contestado en el sentido de que no debe llamarse a la primera isoforma COX-3, sino COX-1b, ya que se expresa por el gen de COX-1 (34), y todavía no se ha encontrado un tercer gen para COX. El entusiasmo que produjo esta hipótesis hace tres años se ha esfumado, y actualmente parece que esta isoforma, por su bajo nivel de expresión y por su cinética, tiene escasa relevancia clínica. Al parecer, la producción de prostaglandinas en las células del endotelio cerebral, que es un hecho crucial en la aparición de la fiebre, es muy sensible al paracetamol, lo que indica que la diana de este fármaco es COX-2 (35). Esta línea de investigación no ha hecho más que iniciarse.

3. ANTIMALÁRICOS. ¿UN PROBLEMA QUE PODRÍA EMPEZAR A SOLUCIONARSE?

La malaria es un gran problema para los países en vías de desarrollo, ya que origina entre 1 y 3 millones de muertes cada año y unos 300 a 500 millones de enfermos (36). Las formas más severas se dan entre los niños del África subsahariana y están producidas por *Plasmodium falciparum*. Los fármacos antimaláricos más utilizados por su bajo coste para este fin son la cloroquina (CQ) (37), un viejo fármaco derivado de la quinina que al acumularse en las vacuolas alimenticias de los trofozoitos intraeritrocíticos inhibe la polimerización a hemozoína del hemo (38, 39), y la asociación sulfadoxina-pirimetamina (SP, Fansidar® de Roche), que inhibe la biosíntesis de ácido fólico. Sin embargo, ambos tratamientos están fracasando por la aparición de resistencias, como puede apreciarse en la Figura 7 (40). Esta circunstancia hace preveer que la cifra de enfermos de malaria se duplicará en el año 2010.

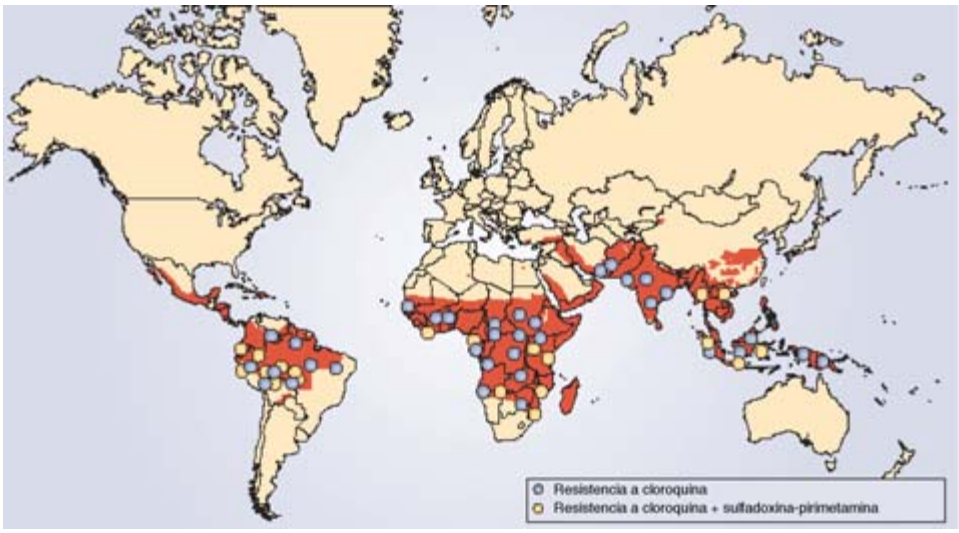


FIGURA 7. *Distribución de la malaria y de zonas en las que el Plasmodium falciparum se ha hecho resistente a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina.*

En el campo de las posibles vacunas se han hecho notables esfuerzos y en el año 2004 ha habido una noticia relevante acerca del éxito de una de ellas desarrollada en Mozambique con la colaboración económica de la Fundación Bill y Melinda Gates, la OMS y otras entidades, en una investigación que está dirigida por el Doctor Pedro Alonso, Investigador del Centro de Salud Internacional del Hospital Clínico de Barcelona. Sin embargo, hoy por hoy se requieren nuevos fármacos que puedan administrarse oralmente, tengan una toxicidad baja, eficacia inmediata, y sean muy baratos, ya que la mayor parte de los enfermos tiene que subsistir con unos 15 $ al mes. Los primeros sustitutos que se propusieron para los fármacos anteriomente mencionados fueron la amodiaquina, en sustitución de la CQ, y el cloproguanilo-dapsona (41) o la atovaquona-proguanilo (Malarona® de GlaxoSmithKline) (42) como combinaciones antifolato. Sin embargo, dada la semejanza en los mecanismos de acción, las resistencias a estos fármacos no se hicieron esperar. Fue entonces cuando cobraron relevancia las artemisininas, entre las que se encuentran los derivados artemeter y artesunato (Fig. 8). Por su nuevo mecanismo de acción y su gran potencia, las artemisininas y, en general, los endoperóxidos antimaláricos no producen resisten-

cias tan facilmente, y parecen la mejor alternativa para el tratamiento de la malaria (43, 44). Debido a que tienen una vida media muy corta (3-5 horas) han de combinarse para aumentar su eficacia con otros antimaláricos como amodiaquina, mefloquina o el derivado fenantrénico lumefantrina.

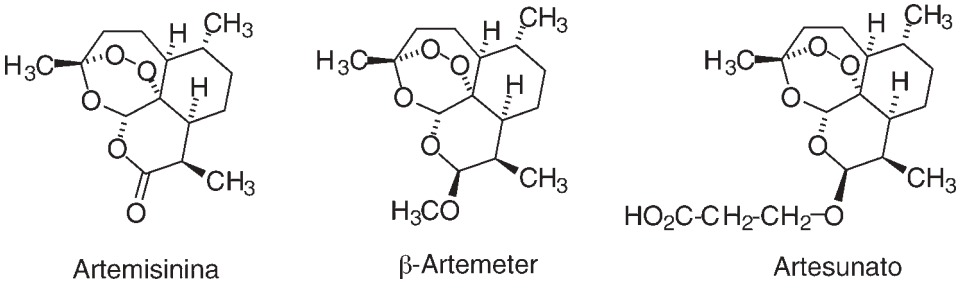
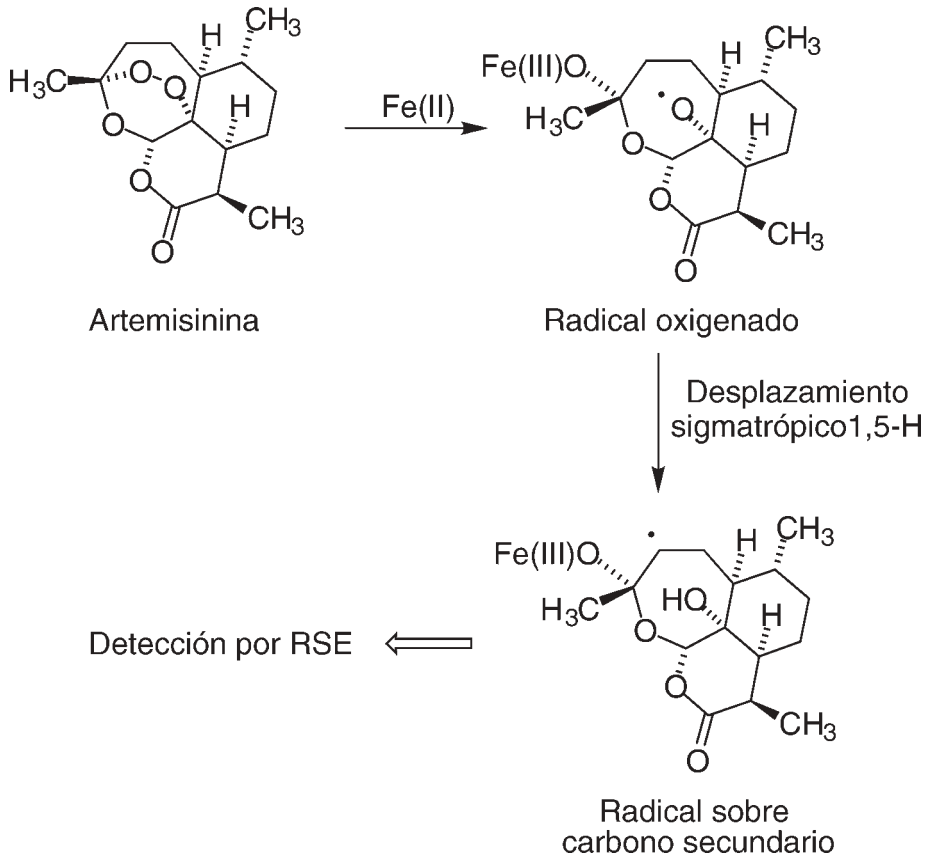


FIGURA 8. *Estructuras de artimisinina y algunos de sus derivados.*

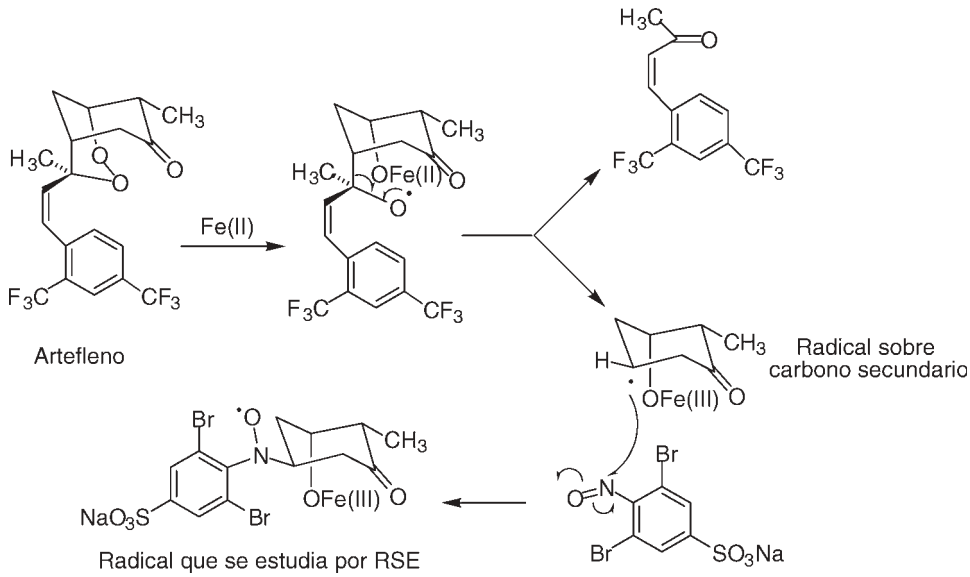
La artemisinina es un producto natural que se aísla de la planta *Artemisia annua* que pertenece a la familia *Asteraceae* y procede de China y Vietnam. Allí se denomina vulgarmente «qing hao», y su extracto se utilizaba como antimalárico y como antihelmíntico con anterioridad al año 168 antes de Cristo. En 1972, unos químicos chinos aislaron de sus hojas un compuesto cristalino al que denominaron «qinghaosu», que es el responsable de dicha acción. La artemisinina no es un heterociclo nitrogenado, como la mayoría de los antimaláricos, sino que es una lactona sesquiterpénica que posee un agrupamiento peróxido en un anillo de trioxano. Este agrupamiento parece indispensable para su actividad y es sorpendentemente estable, aunque el grupo lactona puede hidrolizarse fácilmente. Su mecanismo de acción parece deberse a su interacción con la ferriporfirina IX (hemo) en la vacuola alimenticia del parásito, que posee un pH ácido. Como consecuencia, se originan radicales libres que atacan las membranas celulares, rompiendo su estructura y produciendo la muerte celular. Su acción quimioterápica selectiva se debe a que las células del parásito poseen una alta concentración de Fe^{2+} (45). El grupo peróxido de la artemisinina se rompe por la acción de este catión que se oxida para dar un alcóxido de Fe^{3+} y un radical en el otro oxígeno. Este radical experimenta un rápido des-

plazamiento sigmatrópico 1,5-H y se transforma en un radical de carbono secundario, que puede detectarse por resonancia de espín electrónico, y es al que se atribuye la citotoxicidad (Esquema 7).



ESQUEMA 7

Para entender a fondo este proceso se han llevado a cabo reacciones biomiméticas catalizadas con Fe^{2+} y se han caracterizado los radicales de carbono secundario formados por espectroscopía RSE. Así el artefleno, otro análogo antimalárico desarrollado por Roche, se fragmenta para dar una metilcetona y un radical secundario que puede capturarse con un nitrosoderivado y estudiarse por RSE (Esquema 8) (46).



ESQUEMA 8

Los radicales producidos en la ruptura homolítica de la función endoperóxido de artemisinina y trioxanos relacionados pueden formar aductos covalentes por alquilación de cadenas laterales de proteínas y de determinados lugares de la protoporfirina IX (47).

Cuando la artemisinina se trata con borohidruro sódico se reduce quimioselectivamente el grupo carbonilo de la lactona, para dar un lactol denominado dihidroartemisinina. El diastereoisómero β en forma de éter metílico se denomina β-artemeter (Artenam®) y su éter etílico arteéter. El primero tiene una actividad esquizonticida diez veces mayor que la artemisinina. El artesunato, que es el hemiéster de este lactol con el ácido succínico, es también muy activo. La estructura tridimensional de los derivados de β-artemeter se ha representado en la Figura 9.

El desarrollo del artesunato es fruto de una acción entre Glaxo-SmithKline y WHO-TDR (World Health Organization's Special Programme for Research and training in Tropical Diseases), mientras que artemeter se fabrica bajo los auspicios de la Fundación Novartis para el Desarrollo sostenible en conjunción con «Medicines for Ma-

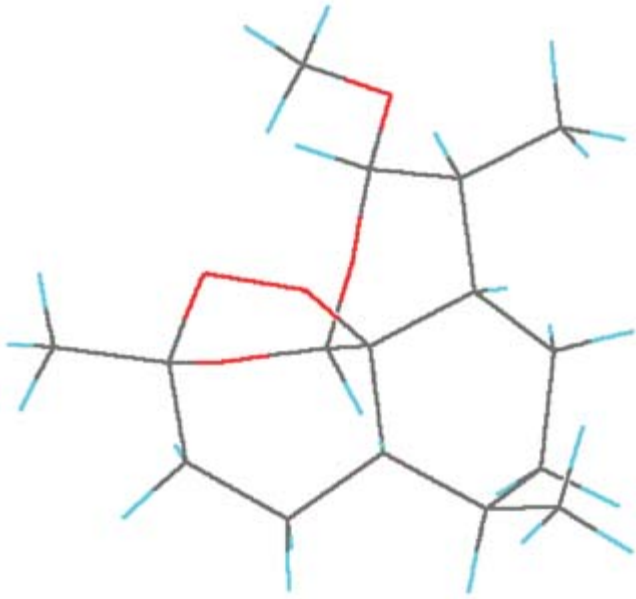
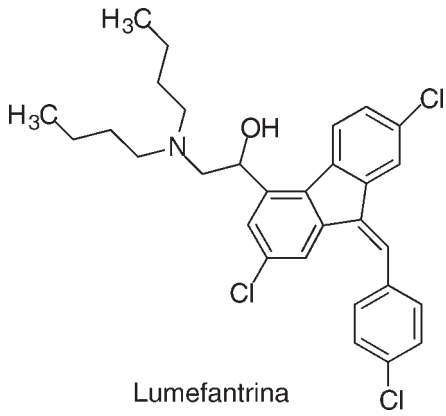


FIGURA 9. *Estructura tridimensional de los derivados de β-artemeter.*

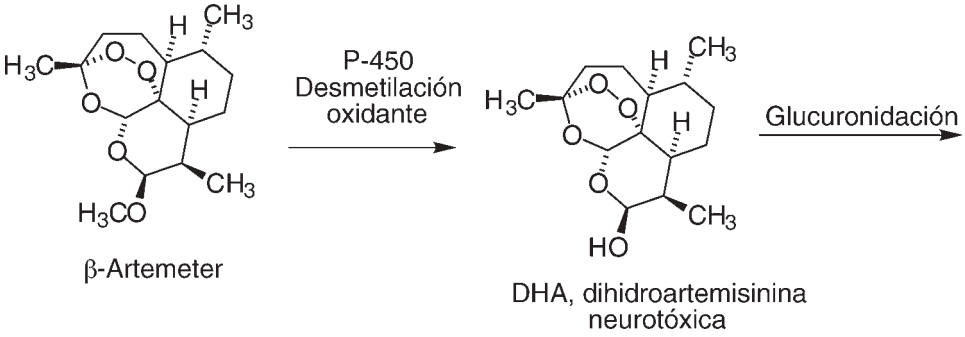
laria Venture» y se administra con el nombre Riamet® en combinación con lumefantrina (también llamada benflumetol), un fármaco sintético de tipo aminoalcohol que es activo por vía oral y tiene una eliminación lenta (Fig. 10) (48).



Lumefantrina

FIGURA 10

La biodisponibilidad de estos endoperóxidos es mala y su eliminación es muy rápida debido fundamentalmente a su estructura de acetal. El artemeter, por ejemplo, se metaboliza por desalquilación oxidante a DHA, un compuesto que se elimina rápidamente como glucurónido pero que, además, es neurotóxico (Esquema 9) (49).



ESQUEMA 9

Por eso, se han sintetizado análogos en los que el oxígeno acetálico exocíclico se ha sustituido por un grupo metileno. Así tenemos los carboderivados (50), como **11** (Fig. 11), en el que se ha introducido una cadena bencénica fluorada para aumentar la actividad. Otro modo de obviar el problema ha sido la síntesis de fenoxiderivados (51) como **12**, en los que no puede producirse dicha desalquilación oxidan-

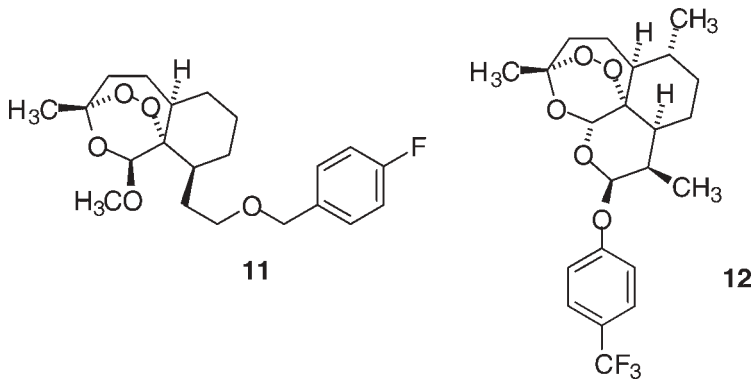


FIGURA 11. *Derivados de DHA con mejor farmacocinética.*

te y se conserva la actividad antimalárica. También se estudian las denominadas trioxaquinas, que son trioxanos enlazados a un grupo de 4-aminoquinolina a través de una cadena espaciadora.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la cloroquina se acumula en la vacuola alimenticia del parásito por su carácter básico, se han diseñado derivados de artemisinina que contienen grupos amino (52). Este diseño se basa en los estudios sobre la cloroquina, la cual se encuentra a pH 7,4 en forma de monocatión (Fig. 12).

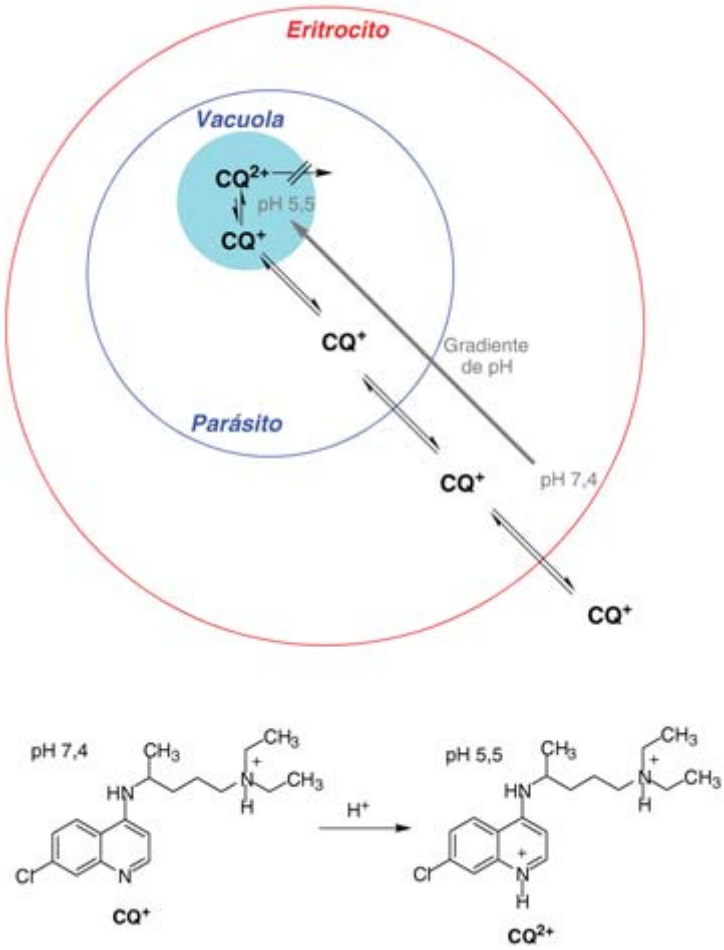
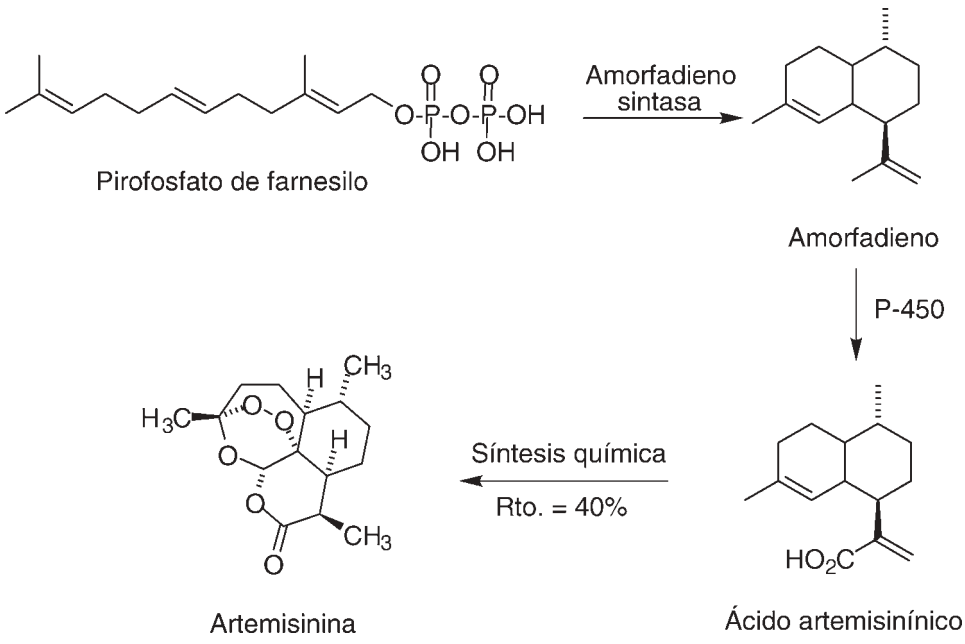


FIGURA 12. *Derivados de artemisinina diseñados para su transporte selectivo.*

Esta forma atraviesa las membranas biológicas y penetra en los glóbulos rojos y en la vacuola alimenticia ácida del parásito de la malaria. El pH ácido de ésta (5,5) transforma a la cloroquina en su forma diprotonada CQ^{2+}, que es ya impermeable al paso de la membrana, por lo que se acumula en dicho lugar.

Como el precio de las artemisininas es muy elevado, y la planta no ha podido cultivarse de forma productiva, la Fundación de Bill y Melinda Gates donó 42,6 millones de dólares a una compañía farmacéutica sin ánimo de lucro para desarrollar un microorganismo capaz de facilitar el acceso a este tipo de antimaláricos. Fruto de esta iniciativa ha sido la obtención en Berkeley, mediante técnicas de biotecnología, de una variedad de *Escherichia coli* que produce gran cantidad de amorfadieno, un terpeno que se obtiene en este microorganismo manipulado por un camino metabólico que se encuentra en levaduras, pero no en *Escherichia coli* nativa. El amorfadieno puede utilizarse en la semisíntesis de artemisinina, que se obtiene a partir de él con un rendimiento total del 40% (Esquema 10).



ESQUEMA 10

Actualmente se trabaja en esta línea, siempre con el fin de reducir los costes de este fármaco, intentando clonar los genes de la planta que intervienen en la biosíntesis de artemisinina e insertarlos en *E. Coli*.

Como conclusión, quisiera resaltar la importancia que tiene en la innovación la interrelación entre distintas áreas científicas y, una vez más, subrayar el papel de una visión química, que puede ser esencial o complementaria, en el entendimiento y en la propuesta de soluciones, dentro de la difícil tarea de la investigación de nuevos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) «La innovación farmacéutica», en *Nuevos Avances en Medicamentos*. *Monografía XV de la Real Academia Nacional de Farmacia* (2004), 11.

(2) «El futuro de los medicamentos», en *Anticipaciones Académicas del Siglo XXI,* Instituto de España, Ed. S. Del Campo (2003), 361.

(3) KING, D. A. (2004): The scientific impact of nations. *Nature*, *430*: 311.

(4) VANE, J.; BOTTING, J., Eds. (1998): «Selective COX-2 Inhibitors; Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential», Kluwer Academic.

(5) MACREADY, N. (1999): COX-2 inhibitors gain more support for use in artritis. *Lancet* 354: 1881.

(6) a) TOPOL, E. J. (2004): Failing the public health-rofecoxib, Merck, and the FDA. *New Engl. J. Med*. 351: 1707. b) FITZ GERALD, G. A. (2004): Coxibs and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med*. 351: 1709.

(7) BAUM, C.; KENNEDY, D. L., FORBES, M. B. (1985): Utilization of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 28: 686.

(8) VANE, J. R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* 231: 232.

(9) LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, R. M. (1995): The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat. Struct. Biol.* 637: 2.

(10) ARMSTRONG, C. P., BLOWER, A. L. (1987): Non-steroidal anti-inflammatory drugs and life threatening complications of peptic ulceration. *Gut*. 28: 527.

(11) a) DE POUVOURVILLE, G. (1992): The economic consequences of NSAID-induced gastropathy: the French context. *Scand. J. Rheumatol.* 49: 53. b) BLOOM, B. S. (1989): Risk and cost of gastrointestinal side effects associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch. Inter. Med.* 149: 1019.

(12) RAZ, A.; WYCHE, A., NEEDLEMAN, P. (1989): Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. *Proc. National Acad. Sci. USA*. 86: 1657.

(13) FU, J. Y.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; RAZ, A., NEEDLEMAN, P. (1990): The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem*. 265: 16737.
(14) XIE, W.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L., SIMMONS, D. L. (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. National Acad. Sci. USA*. 88: 2692.
(15) CROFFORD L. J. (1997): COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol*. 49: 15.
(16) LIPSKY, P. E. (1999): The clinical potential of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am. J. Med*. 106: 51.
(17) En el Esquema 1, las letras N representan al nitrógeno de los cuatro anillos de pirrol de la porfirina, y el quinto ligando del hierro es un resto de cisteína de la enzima.
(18) MALKOWSKI, M. G.; GINELL, S. L.; SMITH, W. L., GARAVITO, R. M. (2000): The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* 289: 1933.
(19) KIEFER, J. R.; PAWLITZ, J. L.; MORELAND, K. T.; STEGEMAN, R. A.; GIERSE, J. K.; HOOD, W. F.; GIERSE, J. K.; STEVENS, A. M., GOODWIN, D. C.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, L. J.; STALLINGS, W. C., KURUMBAIL, R. G. (2000): Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature* 405: 97.
(20) SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M., HLA, T. (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev*. 56: 387.
(21) KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; MCDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C., STALLINGS, W. C. (1996): Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384: 644.
(22) PICOT, D.; LOLL, P. J., GARAVITO, R. M. (1994): The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 367: 243.
(23) BHANDARKAR, M.; BUDESCU, G.; HUMPHREY, W. F.; IZAGUIRRE, J. A.; IZRAILEV, S.; KALÉ, L. V.; KOSZTIN, D.; MOLNAR, F.; PHILLIPS, J. C., SCHULTEN, K. (1999): *Proceedings of the SCS International Conference on Web-Based Modeling and Simulation*.
(24) El dominio EGF es una secuencia formada por 30 o 40 residuos de aminoácidos que es muy semejante al «epidermal growth factor» (EGF). Parece que estas regiones están implicadas en las interacciones de un receptor y sus ligandos y en las interacciones proteína-proteína.
(25) CHENG, Y.; AUSTIN, S. C.; ROCCA, B.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M.; GROSSER, T.; LAWSON, J. A., FITZGERALD, G. A. (2002): Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296, 539.
(26) REDDY, L. R., COREY, E. J. (2005): Facile air oxidation of the conjugate base of rofecoxib. *Tetrahedron Lett., 46*, 927.
(27) a) HALPIN, R. A.; PORRAS, A. G.; GEER, L. A.; DAVIS, M. R.; CUI, D.; DOSS, G. A.; WOOLF, E.; MUSSON, D.; MATTEWS, C.; MAZENKO, R.; SCHWARTZ, J. I.; LASSETER, K. C.; VYAS, K. P., BAILLIE, T. A. (2002): The disposition and metabolism of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human subjects. *Drug Metab. Dispos*. 30: 684. b) SLAUGHTER, D.; TAKENAGA, N.; LU, P.;

ASSANG, C.; WALSH, D. J.; ARISON, B. H.; CUI, D.; HALPIN, R. A.; GEER, L. A.; VYAS, K. P., BAILLIE, T. A. (2003): Metabolism of rofecoxib *in vitro* using human liver subcellular fractions. *Drug Metab. Dispos*. 31: 1398.

(28) Este producto puede acompañar a veces como impureza al rofecoxib comercial.

(29) NICOLL-GRIFFITH, D. A.; YERGEY, J. A.; TRIMBLE, L. A.; SILVA, J. M.; LI, C.; CHAURET, N.; GAUTHIER, J. Y.; GRIMM, E.; LÉGER, S.; ROY, P.; THÉRIEN, M.; WANG, Z.; PRASIT, P.; ZAMBONI, R.; YOUNG, R. N.; BRIDEAU, C.; CHAN, C.-C.; MANCINI, J., RIENDEAU, D. (2000): Synthesis, characterization, and activity of metabolites derived from the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (MK-0966, Vioxx). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 2683.

(30) Se ha descrito que la cardiotoxicidad de Vioxx® sólo se observa tras un año de tratamiento.

(31) SUBBARAMAIAH, K., DANNENBERG, A. J. (2003): Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 96.

(32) FLOWER, R. J., VANE, J. R. (1972): Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 240: 410.

(33) CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S., SIMMONS, D. L. (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 99: 13926.

(34) SCHWAB, J. M.; BEITER, T.; LINDER, J. U.; LAUFER, S.; SCHULZ, J. E.; MEYERMANN, R., SCHLUESENER, H. J. (2003): COX-3-a virtual pain target in humans? *The FASEB J.* 17: 2174.

(35) GREENER, M. (2005): The COX-3 identity crisis. *The Scientist*, 03/28/S41/1.

(36) GREENWOOD, B., MUTABINGWA, T. (2002): Malaria in 2002. *Nature* 415: 670.

(37) WHITE, N. J. (1996): The treatment of malaria. *N. Engl. J. Med*. 335: 800.

(38) La mayoría de los antimaláricos se dirigen contra la fase asexual eritrocítica del parásito. Éste degrada la hemoglobina en su vacuola alimenticia y produce el hemo, que es capaz de reaccionar con oxígeno molecular y generar especies tóxicas. Muchos antimaláricos impiden una importante vía para la destoxificación, como es la polimerización del hemo a hemozoína.

(39) a) SLATER, A. F. (1993): Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther*. 57: 203. b) SULLIVAN, D. J.; GLUZMAN, I. Y.; RUSSELL, D. G., GOLDBERG, D. E. (1996): On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11865.

(40) PLOWE, C. V. (2003): Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J. Exp. Biol*. 206: 3745.

(41) WINSTALEY, P. (2001): Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect. Dis*. 1: 242.

(42) LOOARESUWAN, S.; CHULAY, J. D.; CANFIELD, C. J., HUTCHINSON, D. B. (1999): Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 533.

(43) DHINGRA, V.; RAO, K. V., NARASU, M. L. (2000): Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci*. 66: 279.
(44) ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; DECHY-CABARET, O., MEUNIER, B. (2001): Mechanism of action of artemisinin. *Pure Appl. Chem.* 73: 1173.
(45) Debido a que en el cáncer de mama se encuentra una alta concentración de este catión, la artemisinina se está estudiando para esta posible aplicación.
(46) O'NEILL, P. M.; BISHOP, L. P.; SEARLE, N. L.; MAGGS, J. L.; STORR, R. C., WARD, S. (2000): Biomimetic Fe(II)-mediated degradation of arteflene (Ro-42-1611). The first EPR spin-trapping evidence for the previously postulated secondary carbon-centered cyclohexyl radical. *J. Org. Chem.* 65: 1578-82.
(47) ROBERT, A.; CAZELLES, J., MUNIER, B. (2001): Characterization of the Alkylation Product of Heme by the Antimalarial Drug Artemisinin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 1954.
(48) BASCO, L. K.; BICKII, J., RINGWALD, P. (1998): *In vitro* activity of lumefantrine (benflumetol) against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42: 2347.
(49) MAGGS, J. L.; BISHOP, L. P. D.; EDWARDS, G.; O'NEILL, P. M.; WARD, S. A.; WINSTANLEY, P. A., PARK, B. K. (2000): Biliary metabolites of beta-artemether in rats: biotransformations of an antimalarial endoperoxide. *Drug Met. Disp*. 28: 209.
(50) O'NEILL, P. M.; SEARLE, N. L.; KAN, K. W.; STORR, R. C.; MAGGS, J. L.; WARD, S. A.; RAYNES, K., PARK, B. K. (1999): Novel, potent, semisynthetic antimalarial carbaanalogues of the first-generation 1,2,4-trioxane artemether. *J. Med. Chem*. 42: 5487.
(51) O'NEILL, P. M.; MILLER, A.; WARD, S. A.; PARK, B. K.; SCHEINMANN, F., STACHULSKI, A. V. (1999): Application of the TMSOTf-$AgClO_4$ Activator System to the Synthesis of Novel, Potent, C-10 Phenoxy Derivatives of Dihydroartemisinin. *Tetrahedron Lett*. 40: 9129.
(52) O'NEILL, P. M.; BISHOP, L.; HAWLEY, S. R.; STORR, R. C.; WARD, S. A.; PARK, B. K. (1996): Mechanism-based design of parasite-targeted artemisinin derivatives: synthesis and antimalarial activity of benzylamino and alkylamino ether analogues of artemisinin. *J. Med. Chem.* 39: 4511.

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 905-947

Sesiones

Nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares

JUAN TAMARGO
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

En los países occidentales, las enfermedades cardiovasculares (hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, ictus, taquiarritmias, insuficiencia cardíaca) representan la principal causa de mortalidad (Fig. 1).

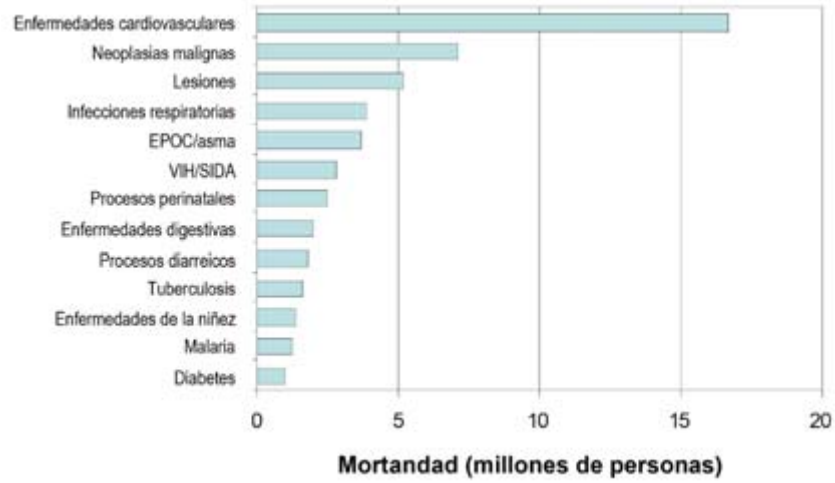


FIGURA 1. *Mortalidad global producida por distintas enfermedades en el año 2002. Tomado del Informe de la OMS (World Health Organization. The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003). EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.*

En España, las enfermedades cardiovasculares fueron responsables el año 2000 de 156.422 fallecimientos, lo que equivale a decir que es casi el 38,5% de las defunciones, duplicando casi los producidos por la segunda causa de mortalidad, el cáncer. En la actualidad, la hipertensión es la enfermedad cardiovascular más prevalente (más de 7 millones de españoles la padecen), la insuficiencia cardiaca representa la primera causa de hostalización en pacientes de más de sesenta y cinco años y el ictus es la primera causa de muerte en la mujer y la segunda causa de incapacidad permanente. Esta alta prevalencia, que es de prever que siga aumentando en un futuro inmediato como consecuencia del aumento progresivo de los factores de riesgo (obesidad, diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión) y de las expectativas de vida de la población, conlleva una alta morbimortalidad y unos elevados gastos económicos, razones que explican el gran interés por desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, más eficaces y seguras que las actualmente disponibles.

En este capítulo centraremos nuestra atención en cinco recientes avances en el desarrollo de fármacos cardiovasculares: a) el tratamiento de las hiperlipidemias, analizando los efectos pleiotrópicos de las estatinas que permiten reducir la morbimortalidad cardiovascular, así como los nuevos fármacos en desarrollo; b) la eplerenona, un bloqueante de los receptores para mineralocorticoides, que utilizada como herramienta de trabajo, ha permitido confirmar que la aldosterona no sólo regula las células epiteliales renales o digestivas, sino que juega un importante papel en los procesos de hipertrofia, fibrosis e inflamación cardiovascular; c) el abordaje de la fibrilación auricular, como paradigma de la nueva forma de enfrentarnos a las arritmias cardíacas; d) el levosimendán, una nueva forma de incrementar la contractilidad cardiaca y de abordar la insuficiencia cardiaca aguda o crónica descompensada y e) la utilización de «stent», es decir, de prótesis metálicas endovasculares que se colocan en un vaso previamente estenosado con el objetivo de mantener el vaso dilatado para que permita un flujo sanguíneo adecuado.

TRATAMIENTO DE LAS DISLIPEMIAS

Las alteraciones del metabolismo lipídico que cursan con un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol y/o de triglicéridos afectan a más del 18% de la población de entre 35-65 años. Estudios epidemiológicos han demostrado que el aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) conduce a la aparición de arteriosclerosis y sus complicaciones (cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, vasculopatías periféricas). Por el contrario, el aumento del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) reduce la incidencia de cardiopatía isquémica, observándose que unos niveles bajos de HDL-C son el factor de riesgo más frecuente en pacientes que presentan signos de cardiopatía isquémica prematura. Por otro lado, la reducción de los niveles elevados de LDL-C retrasa la progresión e incluso reduce el tamaño de la placa de ateroma y se acompaña de una reducción en la incidencia de cardiopatía isquémica y en la mortalidad coronaria. Por tanto, el control de las dislipemias es de crucial interés en la prevención primaria y secundaria de la aterosclerosis y sus complicaciones, que representan la primera causa de muerte en nuestra sociedad.

El *tratamiento farmacológico* de las dislipemias se realiza utilizando fármacos que disminuyen los niveles plasmáticos de: a) colesterol, por inhibir su síntesis hepática [inhibidores de la 3-hidroxi-3-etilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa o estatinas] o su absorción digestiva [resinas: (colestiramina, colestipol, filicol), ezetimiba], y b) los triglicéridos, por aumentar su metabolismo y el de las lipoproteínas de muy baja densidad-VLDL (fibratos, ácido nicotínico).

TRATAMIENTO DE LAS HIPERLIPIDEMIAS

1. Inhibidores de la HMG-COA reductasa (estatinas)

El colesterol forma parte de la membrana celular y es el punto de partida para la síntesis de ácidos biliares y de hormonas esteroideas en las glándulas suprarrenales y las gónadas. Aproximadamente el

80% del colesterol endógeno se sintetiza en el organismo, principalmente en el hígado, a partir de la acetil coenzima A, siendo la enzima limitante de la síntesis la HMG-CoA reductasa, localizada en la superficie de la membrana del retículo endoplásmico, que convierte el 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A en ácido mevalónico (Fig. 2).

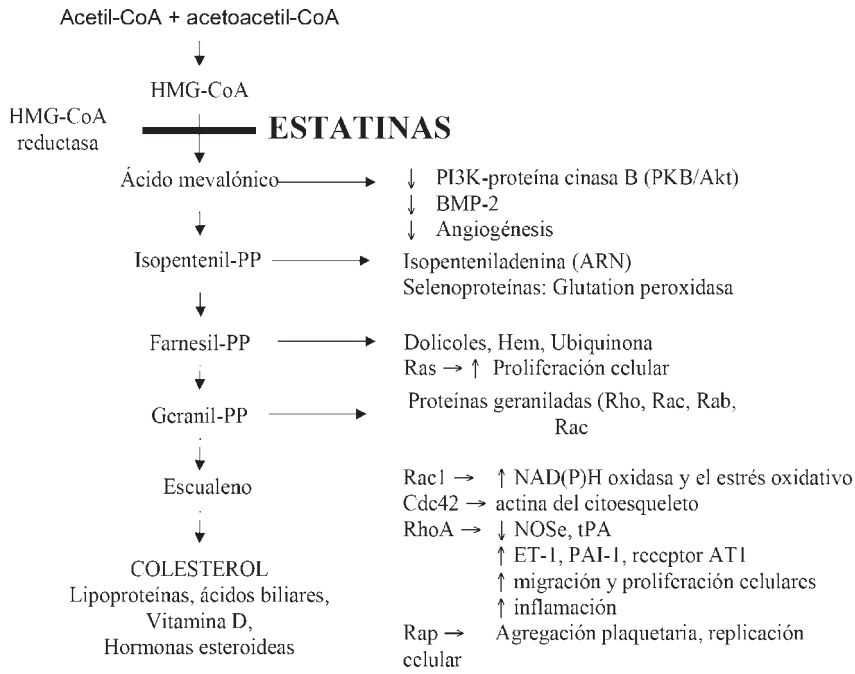


FIGURA 2. *Vía de síntesis del colesterol e intermediarios isoprenoides. BMP: proteína morfogénica ósea tipo 2. HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa. Ver abreviaturas en el texto.*

Las estatinas producen una inhibición potente (constante de inhibición o Ki en el rango nanomolar), competitiva y reversible de la HMG-CoA reductasa. Disponemos de dos grandes grupos de estatinas: naturales (lovastatina, simvastatina y pravastatina) y sintéticas (fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina). Lovastatina y simvastatina son hidrolizadas, en el intestino y el hígado, en sus correspondientes β-hidroxiácidos activos, por lo que se pueden considerar como profármacos. La pravastatina es la más hidrofílica y la simvastatina la más lipofílica; sin embargo, la pravastatina es internalizada

por los hepatocitos a través de mecanismos activos de transporte, lo que explica que su capacidad para inhibir la síntesis de colesterol sea similar a la de otras estatinas. Por ello, no parece que las diferencias en liposolubilidad puedan traducirse en cambios en la potencia hipocolesterolemiante.

Mecanismo de acción

Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa, disminuyendo la síntesis de colesterol. Las células responden a la reducción de los niveles celulares de colesterol libre aumentando la expresión de los genes que codifican la HMG-CoA reductasa y activando diversos factores de transcripción, denominados proteínas de los elementos de unión reguladores de esterol (SREBP); esta activación conlleva su translocación desde la membrana al núcleo celular, donde estimulan la síntesis de receptores para las LDL. Estos receptores, que reconocen a las apolipoproteínas (Apo) B-100 y E, aumentan la captación celular, particularmente por los hepatocitos, del colesterol contenido en las LDL y en sus precursores circulantes (VLDL y lipoproteínas de densidad intermedia-IDL). El resultado es una disminución de los niveles plasmáticos de LDL-C que, a la vez, proporciona a la célula colesterol suficiente para sintetizar membranas celulares, hormonas esteroideas y ácidos biliares. Esto explica porqué las estatinas no producen efectos indeseables a nivel adrenal y gonadal.

Efecto sobre las lipoproteínas plasmáticas

Las estatinas producen una reducción dosis-dependiente de los niveles plasmáticos de LDL-C (20-65%), colesterol total (20-48%) y triglicéridos (5-20%) y aumentan los de HDL-C (5-15%), pero no modifican los niveles de lipoproteína a [Lp(a)]. Las estatinas disminuyen las concentraciones plasmáticas de LDL por reducir la síntesis y secreción hepática de VLDL y aumentar el catabolismo de los precursores de las LDL (VLDL e IDL). Por otro lado, dado que tanto las VLDL como las IDL presentan apoE en su superficie, el aumento de receptores para las LDL, que reconocen las Apo-E producido por las estatinas aumentaría el aclaramiento de estos pre-

cursores. Las estatinas también inhiben la síntesis hepática de las ApoB-100 (que representan un 95% del contenido proteico de las LDL), C-II, C-III y E y aumentan los niveles plasmáticos de las Apo-A-I y A-II, que representan hasta el 80% del contenido proteico de las HDL. Estos cambios hacen que las LDL sean menos susceptibles a la oxidación, disminuyendo los niveles de LDL oxidadas (LDLox) a nivel de la placa de ateroma. Las estatinas también inhiben la actividad de la glicoproteína que transporta el colesterol esterificado (CEPT) desde las HDL a las lipoproteínas que contienen Apo-B; de hecho, una variante del gen que codifica esta enzima permite predecir el beneficio de las estatinas en varones con cardiopatía isquémica. En estudios comparativos, se ha demostrado que atorvastatina reduce LDL y triglicéridos más que las restantes estatinas; a su vez, simvastatina y lovastatina son más potentes que pravastatina y fluvastatina.

Las estatinas reducen los niveles plasmáticos de triglicéridos cuando éstos superan los 250 mg/dl, siendo más evidente esta reducción cuando se utilizan las dosis más altas (80 mg/día) de atorvastatina y simvastatina. Sin embargo, cuando los niveles de triglicéridos son < 250 mg/dl, la reducción no supera el 25%. Las estatinas aumentan los niveles plasmáticos de HDL-C en pacientes con niveles altos de LDL-C y normales de HDL-C (40-50 mg/dl en varones y 40-60 mg/dl en mujeres), pero parecen existir diferencias en la capacidad de las distintas estatinas para aumentar los niveles plasmáticos de HDL-C en pacientes con niveles bajos basales (< 35 mg/dl).

Efectos pleiotrópicos de las estatinas

Diversas evidencias han sugerido que la reducción de la morbimortalidad cardiovascular producida por las estatinas podría ser consecuencia de diversas acciones independientes de la reducción de los niveles plasmáticos de LDL-C:

- El beneficio clínico observado es independiente de los niveles basales o del grado de reducción de las LDL-C y superiores a los que se observan con otros hipolipemiantes, que producen una reducción similar del LDL-C.

- En pacientes con niveles normales de LDL-C, las estatinas producen una reducción de los episodios coronarios similar a la observada en pacientes con hipercolesterolemia.
- En estudios angiográficos, las estatinas reducen los episodios coronarios a pesar de los mínimos cambios observados en las dimensiones de la placa.

Estos hallazgos han llevado a proponer que las estatinas exhiben acciones independientes de la reducción de los niveles plasmáticos de LDL-C (acciones *pleiotrópicas*), que se resumen en la Tabla 1. Estas acciones son debidas a que el bloqueo de la HMG-CoA reductasa disminuye la síntesis de diversos isoprenoides, como el isopentenil pirofosfato (presente en algunos ARN de transferencia), el geranil pirofosfato y el farnesil pirofosfato (Fig. 2). Estos dos últimos regulan la isoprenilación de dolicoles (participan en la síntesis de glipoproteínas), ubiquinona y hemo A (participa en la cadena transportadora de electrones y en la fosforilación oxidativa mitocondrial) y de diversas proteínas de señalización intracelulares (p.ej., proteínas G de pequeño tamaño, Rho A, Ras, Rac1 y Cdc42) necesarias para la proliferación y diferenciación celulares, la expresión génica, el ensamblaje del citoesqueleto, el transporte de lípidos y proteínas y la fibrinolisis. La isoprenilación de Rho determina su localización subcelular; las estatinas inhiben la prenilación y translocación de las proteínas Rho/Ras, lo que conlleva cambios en el citoesqueleto, disminuye la proliferación y migración celulares y aumenta la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Además, el ácido mevalónico regula la vía de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K)-proteína cinasa B (PKB/Akt), la proteína morfogénica del hueso tipo 2 (BMP-2) y la angiogénesis.

TABLA 1. *Acciones pleiotrópicas de las estatinas*

1. Revierten la disfunción endotelial
▪ ↑ la expresión de la eNOS y la liberación de NO
▪ ↓ las LDL, la actividad de NADPH y la producción de radicales libres
▪ ↓ la degradación del NO por radicales superóxido
▪ ↑ las células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea

TABLA 1. *Acciones pleiotrópicas de las estatinas* (cont.)

2. Acciones a nivel de las células musculares lisas vasculares (CMLV)
• ↓ la proliferación y migración
• ↑ la apoptosis de las CMLV
• ↓ la expresión y actividad de los receptores AT1
• ↓ la actividad de NADPH y la síntesis de radicales libres
3. Acciones antiinflamatorias a nivel de la placa de ateroma
• ↓ la adhesión de leucocitos y la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos
• ↓ la actividad del NF-κB
• ↓ la expresión de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas (MMP-1, 2, 3 y 9)
• ↓ el acúmulo, activación y proliferación de macrófagos
• ↓ los niveles de marcadores inflamatorios (PCR)
4. Acciones antihipertensivas
• ↓ la síntesis de endotelina-1 y la expresión de receptores AT1
• ↓ la actividad de la ECA y la expresión de los receptores AT1
• Revierten la disfunción endotelial (ver 1)
5. Acciones antiaterogénicas:
• ↓ la síntesis de LDL y el acúmulo de LDLox y macrófagos en la placa
6. Acciones antitrombogénicas:
• ↓ la agregación plaquetaria y la síntesis de tromboxano A2
• ↓ la expresión del factor tisular y PAI-1
• ↑ la expresión de tPA
• ↓ los niveles plasmáticos de fibrinógeno y la viscosidad sanguínea
7. Acciones inmunomoduladoras
• ↓ la activación de linfocitos B y la proliferación de linfocitos T
• ↓ la migración linfocitaria
• ↓ la conversión de linfocitos T_{h1} en T_{h2} inducida por citocinas
• ↓ la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

CMLV: células musculares lisas vasculares. ECA: enzima de conversión de la angiotensina II. eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial. LDLox: LDL oxidadas. NF-κβ: factor nuclear κB. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno. PCR: proteína C reactiva. tPA: activador tisular del plasminógeno. Th: linfocito T-CD^{4+} o helper.

A continuación analizaremos los efectos pleiotrópicos de las estatinas.

Efectos sobre la función endotelial. La hipercolesterolemia y las LDLox disminuyen la expresión de la NOS3 y la liberación de NO

por las células endoteliales y aumentan la actividad de la NADPH oxidasa (que incrementa la producción de radical superóxido) y de dimetilarginina, que aceleran la inactivación del NO. La NOS3 se encuentra en invaginaciones de la membrana celular (caveolae) unida a la caveolina-1, que inhibe su actividad y cuya actividad aumenta las LDLox. Por tanto, en los pacientes hipercolesterolémicos disminuye la vasodilación endotelio-dependiente inducida por la acetilcolina (*disfunción endotelial*) y las acciones del NO (vasodilatadoras, antiagregantes plaquetarias y antiproliferativas).

Las estatinas normalizan la disfunción endotelial y la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina y aumentan la perfusión de los segmentos isquémicos coronarios; estos efectos aparecen antes de que disminuyan los niveles de LDL-C e incluso en pacientes normocolesterolémicos. La mejoría de la disfunción endotelial se debe a que: a) disminuyen los niveles de LDLox y aumentan la expresión de la NOS3 y la liberación de NO por las células endoteliales; b) inhiben la prenilación de la RhoA y su translocación a la membrana donde inhibe la activación de la NOS3; c) activan la serina/treonina cinasa Akt en las células endoteliales, que fosforila y activa la NOS3; d) disminuyen la expresión de la caveolina-1, aumentando la actividad de la NOS3.

Por otro lado, las estatinas actúan como antioxidantes y barredores de radicales libres, que disminuyen la actividad de la NADPH oxidasa (ya que previenen la prenilación de la p21rac, que participa en la activación de la enzima) y la formación de LDLox y de radical superóxido. Por tanto, las estatinas aumentan la actividad del NO no sólo por estimular su síntesis, sino también por impedir su degradación.

Las estatinas reducen la oxidación de las LDL porque: a) reducen el contenido de ácidos grasos y de colesterol, es decir, la cantidad de sustrato disponible para la oxidación; b) disminuyen la producción celular de oxígeno; c) se unen a la fracción fosfolipídica de las LDL y previenen la difusión de los radicales libres generados en el interior de las lipoproteínas en condiciones de estrés oxidativo, y d) algunas estatinas (atorvastatina, fluvastatina) producen metabolitos que presentan una potente acción antioxidante, que previene la oxidación de las LDL. La inhibición de la oxidación de las LDL dismi-

nuye la formación de células espumosas y el acúmulo de colesterol a nivel de la placa.

Efectos sobre los componentes de la placa de ateroma y el proceso inflamatorio. Las LDLox representan un potente estímulo proinflamatorio a nivel de la placa de ateroma. La adhesión de los monocitos al endotelio alterado y su posterior migración transendotelial es uno de los primeros pasos en la formación de la placa de ateroma. Las moléculas de adhesión (intercelular: ICAM-1, vascular: VCAM-1, integrina CD11b/CD18 y selectinas E, L y P) actúan conjuntamente con las quimiocinas generadas por el endotelio, las células musculares lisas y los monocitos (p.ej., interleucina-8, proteínas quimiotácticas de monocitos-MCP-1 y granulocitos-GCP, proteína inflamatoria de los macrófagos MIP-1α, leucotrieno B4, RANTES) para atraer más monocitos y células T a la pared arterial. A su vez, la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) producida por las LDLox en los macrófagos activados y en las células musculares lisas vasculares aumenta la expresión de la integrina CD40/CD40 que, a su vez, activa diversas citocinas proinflamatorias [factor de necrosis tumoral-TNFα, interleucinas-IL, interferón γ, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)], moléculas de adhesión y quimiocinas necesarias para la migración de leucocitos y macrófagos. Los macrófagos, además, juegan un importante papel en la estabilidad de la placa de ateroma, ya que liberan metaloproteinasas [MMP 1 (colagenasa), 3 (estromelisina) y 9 (gelatinasa)], que degradan la matriz extracelular y destruyen la capa fibrosa, facilitando la rotura de las placas y la aparición de síndromes coronarios agudos (angina inestable, infarto de miocardio). Es decir, que el proceso inflamatorio facilita el desarrollo de placas con un gran núcleo graso, un marcado numero de macrófagos y una pobre cápsula fibrosa son las que presentan un mayor riesgo de ruptura y de trombosis.

Las estatinas estabilizan la placa de ateroma porque inhiben: a) la interacción leucocitos-células endoteliales, la expresión de moléculas de adhesión por células endoteliales y musculares lisas vasculares y monocitos y la entrada de éstos al subendotelio; b) el acúmulo de macrófagos y lincofitos T y la activación del NF-κB, así como la expresión de las MMP-1 y 3, a la vez que aumentan el contenido de colágeno intersticial; c) la oxidación de las LDL, su capta-

ción por los receptores barredores de los macrófagos (CD36, A1 y LOX-1) y el acúmulo de ésteres de colesterol en los macrófagos de la placa; d) la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares; e) la expresión de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por las células endoteliales, musculares lisas y monocitos, y f) los niveles plasmáticos de diversos marcadores inflamatorios (proteína C reactiva-PCR, selectina P, IL-6, TNFα, ICAM-1). En pacientes con estenosis carotídea, el tratamiento con pravastatina (40 mg/día) durante tres meses antes de la endarterectomía reducía el contenido lipídico, de LDLox, macrófagos y células T en las placas; éstas, además, presentaban un mayor contenido de colágeno, una reducción en los niveles de MMP-2 y un incremento en los niveles del inhibidor de las MMP-1 y MMP-9. Todos estos efectos explican porqué las estatinas aumentan la estabilidad de la placa y reducen la incidencia de síndromes coronarios agudos.

Efectos sobre la proliferación, migración y apoptosis de miocitos. Las estatinas inhiben la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares y aumentan su apoptosis, efectos atribuidos a la inhibición de Rho, que aumenta los niveles de diversos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas ($p21^{Waf1}$, $p27^{Kip1}$) e inhibe la síntesis de ADN. Estas acciones exlican porqué las estatinas disminuyen la restenosis posangioplastia, la oclusión de injertos vasculares o la vasculopatía postransplante.

Acciones antitrombóticas. Las LDLox aumentan la agregación plaquetaria, un efecto que podría atribuirse a cambios en el contenido de colesterol de la membrana plaquetaria, que alterarían su fluidez y a un aumento en la densidad de receptores α_2-adrenérgicos y en la [Ca] intraplaquetaria. Por otro lado, en pacientes hipercolesterolémicos aumentan los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), factor tisular y fibrinógeno y disminuyen los del activador tisular del plasminógeno (tPA). Todos estos cambios aumentan el potencial trombogénico de la placa, disminuyen la fibrinolisis y facilitan la formación del trombo oclusivo.

Las estatinas inhiben la agregación plaquetaria producida por ADP, colágeno y fibrinógeno y la producción plaquetaria de tormboxano A2 (TXA2) y potencian las acciones antiagregantes del NO, quizá por inducir cambios en el contenido de colesterol en la mem-

brana plaquetaria, aumentar el cotransporte Na/H o por sus propiedades antioxidantes; de hecho, las estatinas disminuyen los niveles de LDLox y 8-epi-prostaglandina I2, dos potentes activadores de la agregación plaquetaria. Además, las estatinas disminuyen los niveles de fibrinógeno, la viscosidad sanguínea y la expresión de factor tisular y aumentan la fibrinolisis, ya que reducen la expresión y los niveles plasmáticos de PAI-1 y aumentan la expresión de tPA por las células endoteliales. Estos efectos pueden bloquearse por el geranil pirofosfato.

Acciones protectoras cardiovasculares. Las estatinas reducen la presión arterial, un efecto que podría explicarse por su capacidad para: a) disminuir los niveles plasmáticos de endotelina-1 y la expresión de ARN mensajero de la pre-proendotelina-1 en las células endoteliales; b) inhibir la hipertrofia-hiperplasia y aumentar la apoptosis de las células musculares lisas vasculares; c) aumentar la liberación de NO, y d) modular la actividad del sistema renina-angiotensina tisular. La angiotensina II (AII) estimula la actividad de la NADPH y la producción de radicales libres por las células musculares lisas vasculares, aumentando la degradación del NO; en pacientes hipercolesterolémicos aumenta la expresión de los receptores AT1 y la infusión de AII produce mayores respuestas hipertensivas que en los normocolesterolémicos. Las estatinas reducen la actividad de la enzima de conversión, revierten la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos y del NF-κB producida por la AII y normalizan la densidad de receptores AT1 y la respuesta presora inducida por la AII. Las estatinas ejercen un efecto cardioprotector en modelos animales de isquemia-reperfusión coronaria, producen la regresión de la hipertrofia y la fibrosis ventricular inducidas por la AII, a la vez que mejoran la función sistólica/diastólica ventricular y disminuyen la incidencia y las hospitalizaciónes por insuficiencia cardíaca en pacientes con cardiopatía isquémica.

Efectos sobre la angiogénesis. A dosis bajas, las estatinas podrían aumentar la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales y promover neovascularización del miocardio isquémico al movilizar células progenitoras endoteliales desde la médula ósea. En pacientes con angina crónica estable, el tratamiento durante cuatro semanas con atorvastatina (40 mg/día) triplicaba las células progenitoras y aumentaba la migración de éstas inducida

por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Tras un episodio isquémico, las células progenitoras endoteliales se localizan en los puntos de neovascularización y se diferencian en células endoteliales *in situ*, lo que podría significar un nuevo concepto en el tratamiento de la enfermedad coronaria. Estos efectos están mediados a través de la activación de la vía PI3K/Akt. Sin embargo, a dosis altas, las estatinas pueden inhibir estos procesos y la liberación de VEGF y aumentar la apoptosis de las células endoteliales. En un modelo murino de infarto de miocardio (IM) la movilización de células progenitoras endoteliales reducía el área de necrosis y la mortalidad y mejoraba la función ventricular.

Acciones antiarrítmicas. En pacientes con fibrilación auricular, las estatinas facilitan el mantenimiento del ritmo sinusal y previenen las recurrencias. En pacientes con cardiopatía isquémica este efecto es independiente de cambios en los niveles plasmáticos de LDL-C, ya que no se observa con otros hipolipemiantes (fibratos, probucol). El efecto antiarrítmico de las estatinas ha sido atribuido a su capacidad para prevenir la progresión de la placa coronaria y a sus acciones antiinflammatorias, antiproliferativas y antioxidantes.

Immunomodulación. En pacientes sometidos a transplante cardiaco, la asociación de estatinas al tratamiento antirechazo (ciclosporina, prednisona, azatioprina), aumenta la supervivencia y reduce la frecuencia de rechazos y la incidencia de coronariopatía acelerada. Atorvastatina, lovastatina y pravastatina disminuyen el complejo mayor de histocompatibilidad tipo-II (MHC-II) inducido por el interferon-g en macrófagos y células endotalieles, comportándose como represores de la activación de los linfocitos T.

Usos clínicos

Las estatinas son los fármacos más efectivos y mejor tolerados en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterozigótica o poligénica y en los de alto riesgo (con IM, diabetes o síndrome nefrótico). Sin embargo, no son efectivos en pacientes con hipercolesterolemia familiar homozigótica, en los que ambos alelos del gen que codifica el receptor de las LDL son disfuncionales o con hipertriglice-

ridemia grave. En hiperlipidemias combinadas pueden asociarse dosis bajas de estatinas con fibratos o ácido nicotínico.

Estudios de prevención primaria y secundaria. En 14 estudios randomizados, que incluían 90.056 pacientes, cuatro de prevención primaria [en pacientes hipercolesterolémicos (WOSCOPS), normocolesterolémicos con cifras bajas de HDL-C (AFCAPS/TexCAPS), hipertensos (HPS) y ancianos (PROSPER)] y 10 de prevención secundaria en pacientes coronarios (GISSI-P, CARE, 4S, LIPID, Pot-CAGB, LIPS, ALERT, ASCOT, ALLHAT) o diabéticos (CARDS), las estatinas reducían significativamente la mortalidad coronaria, la necesidad de revascularización coronaria, la incidencia de ictus fatal o no y la mortalidad total y vascular. Más aún se pudo demostrar que producían una reducción del 12% en la mortalidad por cualquier causa por mmol/L de reducción de LDL-C. Estos efectos eran independientes de la edad y sexo del paciente, de los niveles basales de LDL-C y de la presencia o no de hipertensión arterial, diabetes o vasculopatía coronaria, cerebral o periférica, pero eran más evidentes en los fumadores. En estudios de prevención secundaria realizados en pacientes con hipercolesterolemia y cardiopatía isquémica (CARE, 4S, *HPS,* LIPID, LIPS, GREACE), las estatinas retrasan la progresión e incluso inducen la regresión de las lesiones arterioscleróticas coronarias y reducen la mortalidad total, las revascularizaciones coronarias y la incidencia de ictus. En pacientes con síndromes coronarios agudos (angina inestable o IM sin onda Q), la atorvastatina reduce el objetivo compuesto de muerte total, IM, angina inestable que requiere rehospitalización, revascularización e ictus. Es importante señalar que estos efectos se producen sin que se haya podido constatar un aumento en la incidencia de cáncer o en la mortalidad total o no cardiovascular.

Dos meta-análisis de ensayos clínicos realizados en más de 70.000 pacientes demostró que las estatinas disminuyen la incidencia de ictus no fatal (21%) y no aumentan la de ictus hemorrágico, lo que se ha atribuido a la mejoría de la disfunción endotelial y a sus acciones antiagregantes, antiinflamatorias y profibrinolíticas. Además, se pudo calcular que: a) una reducción en los niveles de LDL-C del 10% disminuía el riesgo de ictus en un 15,6% y el cociente grosor íntima/media carotídea en un 0,73%/año. Las estatinas también retrasan la progresión de la estenosis carotídea en pacientes sin historia previa

de episodios cardiacos y cerebrovasculares y disminuyen el cociente íntima-media de la carótida en pacientes con hipercolesterolemia o cardiopatía isquémica. Igualmente, reducen el cociente íntima-media en la arteria femoral de los pacientes con cardiopatía isquémica y mejoran la sintomatología en los que presentan claudicación intermitente.

Recientemente, diversos estudios (REVERSAL, ASCOT, HPS, GREACE, PROVE IT) han demostrado que no existe un nivel umbral a partir del cual una reducción de los niveles de LDL-C no disminuya los eventos cardiovasculares y que en los pacientes de alto riesgo se deberían reducir las cifras de LDL-C hasta valores ≤ 70 mg/dL (1,81 mM/L), utilizando para ello estatinas asociadas a otros hipolipemiantes, como la ezetimiba.

2. Ezetimiba

En condiciones normales, el colesterol intestinal procede en un 35% de la dieta y el 65% restante de los ácidos biliares sintetizados en el hígado y eliminados por vía biliar. La *ezetimib*a, cuya estructura se muestra en la Figura 3, se acumula y actúa a nivel de la superficie de las células de cepillo intestinales, inhibiendo a este nivel el transportador del colesterol codificado por el gen NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1) (Fig. 4).

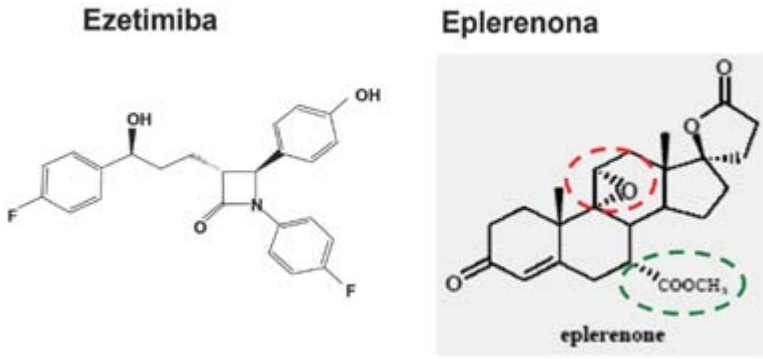


FIGURA 3. *Estructura química de ezetimiba y eplerenona.*

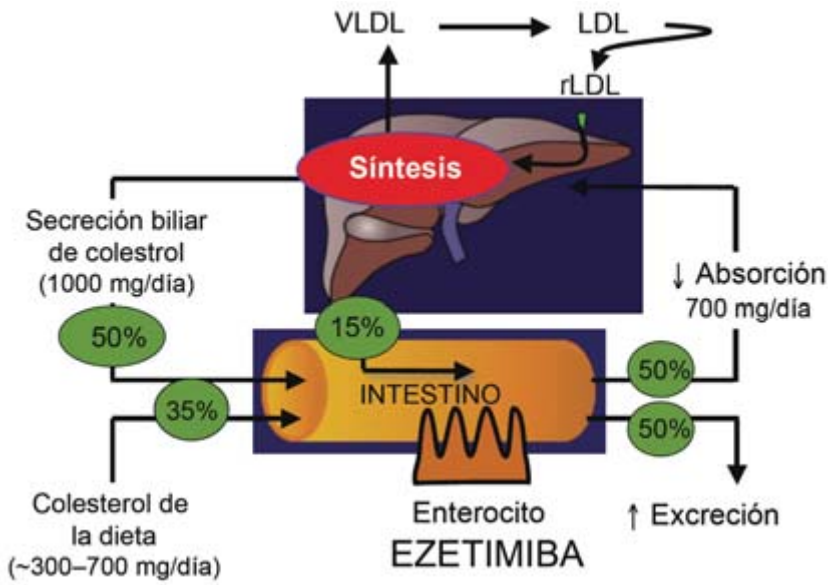


FIGURA 4. *Mecanismo de acción de la ezetimiba. Lipoproteínas de muy baja (VLDL) y baja densidad (LDL). rLDL: receptores para las LDL.*

Como consecuencia, en pacientes con hipercolesterolemia, la ezetimiba inhibe en un 59% la absorción de colesterol, tanto de origen exógeno-dieta como endógeno-biliar, cuya excreción fecal aumenta; sin embargo, no modifica la absorción de vitaminas liposolubles o de triglicéridos. Como consecuencia de esta menor reabsorción de colesterol, en los hepatocitos aumenta la expresión de receptores para las LDL, lo que reduce los niveles plasmáticos de LDL-C (15-20%) y la expresión de la HMG-CoA reductasa, con lo que el organismo intenta compensar el colesterol excretado por heces. Este aumento es la base de la asociación de ezetimiba con estatinas, que produce una reducción adicional del 17-21% en los niveles de LDL-C sobre el efecto producido por dosis altas de éstas (40-80 mg/día). Más aún, la asociación de ezetimiba (10 mg) con la dosis más baja de una estatina permite alcanzar una reducción similar a la conseguida a las dosis más altas de la estatina, lo que se traduce en una mejor tolerancia, ya que las reacciones adversas de las estatinas son dosis-dependientes. En la actualidad esta asociación de ezetimiba y estatinas representa una alternativa en pacientes con hipercolesterolemia heterozigótica, familiar o no, que no responde a estatinas o en la que están contraindica-

das. Además, a diferencia de las estatinas, la ezetimiba es efectiva en pacientes con hipercolesterolemia homozigótica familar y con sitosterolemia homozigótica, enfermedad asociada a una mutación recesiva de los genes ABCG5 o ABCG8, que impide la excreción intestinal de los esteroles vegetales que se ingieren con la dieta (sitosterol y campesterol).

3. Nuevas perspectivas en el tratamiento de las hiperlipidemias

A pesar de la probada eficacia del tratamiento hipolipemiante, casi un 80% de los pacientes con cardiopatía isquémica no alcanzan las cifras de LDL-C recomendadas en las Guías internacionales (< 100 mg/dL). Por ello, es necesario desarrollar nuevos fármacos hipolipemiantes que permitan un mejor control del paciente (Tabla 2).

TABLA 2. *Nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las hiperlipidemias*

1. Inhibidores de la síntesis de colesterol
- Inhibidores de HMG CoA reductasa: pitavastatina
- Inhibidores de escualeno sintasa y escualeno ciclasa

2. Inhibir la absorción de colesterol a nivel intestinal:
- Reducir la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP) y del ensamblaje de las VLDL: BMS-201030, BMS-201038, BMS-200150, BMS-212122, BAY-139952, CP-467688, CP-319340, R-103757, GW-328713
- Inhibidores de la reabsorción de ácidos biliares: colesevelam
- Inhibidores de la ACAT: avisimiba, CS-505, F-12511, F-1394, TS-892
- Inhibidores de la lipasa hepática
- Inhibidores del transporte de ácidos biliares en el íleon: S-8921

3. Activar la lipoproteína lipasa: NO-1886
4. Aumentar la síntesis de HDL: CI-1027, administración i.v. de HDL naciente o de Apo1
5. Inhibidores de la CETP: torcetrapib, JTT-705, inmunización
6. Aumentar la expresión de las enzimas implicadas en el transporte reverso de colesterol (LCAT, ABC-1, SR-AI, SR-B1 y ABCG1)
7. Agonistas de los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARα, β o γ)

ACAT: acil colesterol acil transferasa, CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol, LCAT: lecitin-colesterol-aciltransferasa.

Inhibidores de la síntesis de colesterol. En la actualidad, se desarrollan nuevas estatinas que producen una inhibición más potente y prolongada de la HMG-CoA reductasa hepática (hepática > muscular), una mayor reducción de las VLDL y un mayor aumento del HDL-C y que no se biotransformen a través del citocromo P450 con el fin de reducir el riesgo de interacciones medicamentosas. Este es el caso de la pitavastatina (NK-104).

Recientemente, se ha comercializado la asociación de lovastatina y ácido nicotínico (10-20 mg + 0,5-2 g), que reduce los niveles de LDL-C (43%), triglicéridos (42%) y apolipoproteína(a) (18%) y aumenta los de HDL-C (30%). Sin embargo, esta asociación produce hiperglucemia, enrojecimiento cutáneo y aumenta los niveles plasmáticos de transaminasas (< 1%).

Fármacos que inhiben la absorción digestiva de grasas. Esto se puede conseguir con fármacos que interfieren con: A) la *reabsorción intestinal de ácidos biliares o el transportador de ácidos biliares en el íleon* (IBAT). El colesevelam es un polímero que no se absorbe y, a diferencia de las resinas, no modifica la absorción de vitaminas o de anticoagulantes orales; combinado con estatinas presenta efectos aditivos para reducir los niveles de LDL-C. Presenta mejor tolerancia que las resinas, si bien produce estreñimiento y dispepsia. B) *La absorción intestinal del colesterol*. En ratones con un déficit de apoE, el FM-VP4, un análogo del fitostanol que inhibe un transportador Na^+-dependiente situado en la superficie luminal de los enterocitos ileales, disminuye el peso corporal, los niveles de colesterol total (50-70%) y el desarrollo de lesiones arterioscleróticas. El 264W94 es un fármaco que reduce los niveles de LDL-C (8%) y aumenta los de HDL-C (5%) y triglicéridos (18%). C) *La proteína microsomal de transporte de triglicéridos* (MTP), que transfiere los triglicéridos hacia los quilomicrones y las VLDL nacientes; como resultado, disminuyen los niveles plasmáticos de triglicéridos y la producción de LDL a partir de las VLDL. D) *La actividad de la acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa* (ACAT), enzima localizada en el retículo endoplásmico rugoso y que cataliza la reesterificación del colesterol y ácidos grasos de cadena larga en ésteres de coleserol. La avasimiba es un inhibidor de la ACAT-1, isoforma que se encuentra en diveros tejidos, incluidos los macrófagos. En modelos animales,

reduce los niveles de triglicéridos y LDL-C (50%) y los de los ésteres de colesterol en los macrófagos y en las placas de ateroma, lo que podría estabilizar su progresión. Sin embargo, el contenido hepático de triglicéridos aumenta de forma dosis-dependiente hasta 2-7 veces y, en cualquier caso, los ratones que carecen de ACAT-1 no muestran una menor susceptibilidad al desarrollo de arteriosclerosis. La ACAT-2 se encuentra en el intestino y en el hígado, donde participa en la formación de los ésteres de colesterol y su inhibición debería reducir la producción de quilomicrones y VLDL.

Fármacos que aumentan los niveles de HDL-C. Las HDL eliminan el exceso de colesterol de las células, transportándolo hacia el hígado para eliminarlo por bilis. La reducción de los niveles de HDL-C se asocia a un aumento en la morbimortalidad cardiovascular y en los niveles de triglicéridos y partículas LDL pequeñas y densas, resistencia a la insulina, un estado proinflamatorio y protrombótico e hipertensión arterial. Por el contrario, los pacientes con hiperalfalipoproteinemia familiar, que cursa con elevaciones de HDL-C presentan una baja incidencia de cardiopatía isquémica y mayor longevidad. El HDL-C revierte la disfunción endotelial, estimula la producción de prostaciclina (que exhibe propiedades antiagregantes, vasodilatadoras y antimitogénicas) e inhibe la apoptosis de las células endoteliales, la agregación plaquetaria y la oxidación de las LDL. Además, en pacientes con síndromes coronarios agudos, la administración i.v. semanal de Apo A-I Milano recombinante durante cinco semanas reduce el volumen de las placas ateromatosas.

Estatinas, fibratos y ácido nicotínico aumentan discretamente el HDL-C (6-14%, 6-20% y 15-35%, respectivamente). Una posibilidad para aumentar los niveles de HDL-C es inhibir la glicoproteína que transporta los ésteres de colesterol (CETP) desde las HDL a las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) que contienen apo-B. La disminución de CETP se asocia a un marcado aumento en los niveles plasmáticos de HDL-C (> 89 mg/dL), mientras que en pacientes con diabtes tipo 2, el aumento de los niveles de CETP aumenta los eventos cardiovasculares y arteriosclerosis coronaria. La inhibición de la CETP con anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos antisentido o fármacos (torcetrapib, JTT-705) aumenta los niveles de cHDL. En pacientes con niveles bajos de HDL-C (< 40 mg/

dL), torcetrapib reduce la actividad de la CETP, aumenta los niveles plasmáticos de HDL-C (45-106%) y disminuye los de LDL-C (10-42%). Resultados similares han sido observados con JTT-705.

Agonistas mixtos de los receptores activados por proliferador de peroxisomas tipo α y γ. Combinan los efectos hipolipemiantes de los fibratos y de los hipoglucemiantes de la familia de las tiazolidindionas (glitazonas), lo que les convierte en fármacos de interés en pacientes hiperlipidémicos y diabéticos, sean o no hipertensos.

Sobreexpresar los genes responsables del transporte inverso de colesterol. Ello puede conseguirse activando: a) la lecitina-colesterol acetiltransferasa (LCAT), que esterifica el grupo 3-β-hidroxi del colesterol en las HDL; el déficit familiar de LCAT cursa con hipertrigliceridemia y un déficit de HDL; b) Los receptores barredores localizados en los macrófagos (SR-AI) o en la membrana celular (SR-β1); c) la proteína ABC A1, que transloca el colesterol libre desde la cara interna a la externa de la membrana celular, desde donde pasa a las HDL; d) la lipoproteína lipasa, enzima que hidroliza las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones). La activación de esta enzima con NO-1886 reduce los niveles de triglicéridos, aumenta los de HDL-C y reduce las lesiones arterioscleróticas coronarias.

ANTAGONISTAS DE LA ALDOSTERONA

Clásicamente se pensaba que la aldosterona, el principal mineralocorticoide endógeno, se sintetizaba en la zona glomerulosa de la corteza adrenal. A este nivel, su síntesis y liberación no depende de la secreción de hormona adenocorticotropa (ACTH), sino que es regulada por la AII, que estimula los receptores AT1 de las células de la zona glomerulosa, y por los niveles plasmáticos de potasio; en menor medida, las catecolaminas, la serotonina, la endotelina-1 y el NO también aumentan la síntesis y liberación de aldosterona. Por el contrario, la síntesis de aldosterona es inhibida por la somatostatina, la heparina, los péptidos natriuréticos auriculares y la dopamina. Sin embargo, hoy sabemos que la aldosterona también se sintetiza

en otros muchos tejidos (corazón, cerebro, vasos, fibroblastos) en los que existen tanto receptores mineralocorticoideos como la aldosterona sintasa (CYP11B2) necesaria para su síntesis *in situ*. Por último, debemos señalar que los pacientes con hiperaldosteronismo primario no sólo son hipertensos, sino que presentan una mayor incidencia de hipertrofia cardiaca, IM, retinopatías, proteinuria, fibrilación auricular y accidentes cerebrovasculares que la población hipertensa general. Ello confirma que la aldosterona aumenta la morbimortalidad cardiovascular.

Mecanismo de acción de la aldosterona

La aldosterona atraviesa la membrana celular de las células diana e interactúa con sus receptores intracitoplasmáticos, denominados receptores mineralocortides (RM) tipo I (Fig. 5).

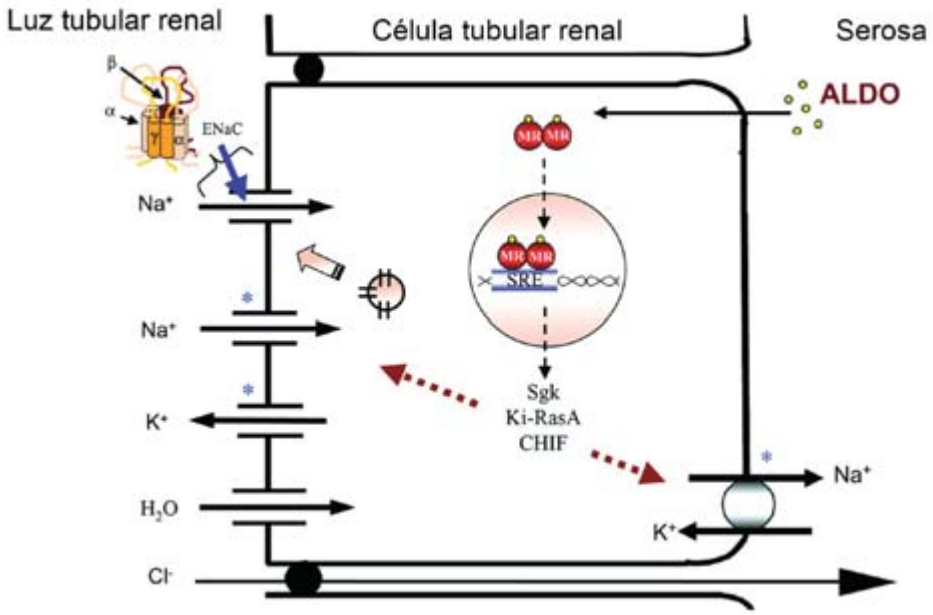


FIGURA 5. *Acciones genómicas de la aldosterona en las células epiteliales renales.*

La unión de la aldosterona a sus receptores forma un complejo hormona-receptor que se transloca al núcleo, donde interactúa con secuencias de ADN específicas, denominadas *elementos de respuesta a mineralocorticoides*, que estimulan o reprimen la transcripción génica de ARN mensajeros específicos que modulan la síntesis de determinadas proteínas. A nivel de las células de los túbulos contorneados distales y colectores renales, la aldosterona aumenta tanto la expresión de los canales de Na (ENaC o sensibles a amilorida) como la probabilidad de apertura de los mismos, lo que facilita la reabsorción tubular de Na. Además, aumenta la actividad de la ATPasa Na/K-dependiente de la membrana basolateral, lo que facilita el paso de Na hacia la circulación sistémica, y la actividad mitocondrial, con el consiguiente incremento en la producción celular de ATP. El aumento de la reabsorción de Na aumenta la negatividad en la luz tubular y facilita la eliminación urinaria de K e H (los efectos sobre la excreción de hidrogeniones tienen lugar fundamentalmente en las células intercalares). Estos efectos de la aldosterona están mediados a través de la inducción de dos cinasas, la serina-treonina cinasa (Sgk1) y la PI3K, la proteína Kirsten Ras, y del factor inducido por corticoides (CHIF).

En las células epiteliales del riñón, los efectos mediados a través de la estimulación de los RM tipo I requieren la modulación de la expresión génica y la síntesis de proteínas, por lo que aparecen con una latencia de 1-2 horas. Sin embargo, sabemos que determinadas acciones de la aldosterona son inmediatas (es decir, no genómicas), por lo que deben estar implicados otros mecanismos de acción que no son muy bien conocidos. Entre estos mecanismos no genómicos de la aldosterona están: a) la activación de la vía fosfolipasa C-proteína cinasa C; b) la unión de la aldosterona a RM modificados por diversas chaperonas; c) la activación de la vía de la proteína cinasa A, con el consiguiente aumento de los niveles intracitoplasmáticos de AMPc, y d) la posible activación de receptores específicos para la aldosterona distintos de los RM tipo I.

Antagonistas de la aldosterona

Aunque los inhibidores de la enzima de conversión (IECA) y los antagonistas de los receptores AT1 de la AII inhiben la liberación de

aldosterona al comienzo del tratamiento, se puede observar como al cabo de 2-3 meses los niveles de aldosterona recuperan sus valores basales. Este resultado no es ninguna sorpresa si tenemos presente que la liberación de la aldosterona está regulada por otros muchos factores independientes de la AII.

TABLA 3. *Comparación de la afinidad de espironolactona y eplerenona por los receptores de esteroides*

Receptor	**Espironolactona (μM)**	**Eplerenona (μM)**
Mineralocorticoide	0,002	0,081
Glucocorticoide	2,899	> 100
Andrógenos	0,013	4,827
Progesterona	2,619	> 100

Los valores se expresan como la concentración de fármaco necesaria para inhibir el 50% de la respuesta obtenida con 0,5 nM de aldosterona (receptor mineralocorticoide), 5 nM de dexametasona (receptor para los glucocorticoides) y 10 nM de dihidrotestosterona (receptor para los andrógenos) o como la concentración de fármaco que produce una activación del 50% de los receptores de progesterona. Tomada de Garthwaite y McMahon.

La espironolactona es un antagonista de la aldosterona que ha demostrado eficacia clínica para prevenir la hipopotasemia (inducida por diuréticos tiazídicos y del asa, anfotericina B o corticoides o presente en pacientes con síndrome nefrótico, diarrea, acidosis tubular) y en el tratamiento de ascitis, hipertensión arterial e insuficiencia cardiaca. Sin embargo, este fármaco produce una alta incidencia de reacciones adversas, algunas de las cuales son consecuencia de su gran afinidad por los receptores para andrógenos y progesterona (ginecomastia, mastodinia, impotencia y alteraciones en el ciclo menstrual), lo que se traduce en un mal seguimiento del tratamiento o en el abandono del mismo. Por todo lo anterior, es evidente que sería de gran interés disponer de fármacos que actuaran como antagonistas selectivos de los RM. Este es el caso de la eplerenona, un nuevo antagonista competitivo de los RM (Figura 3), que presenta alta afinidad por estos receptores y baja por los receptores estrogénicos y de progesterona (< 1% y 0,1% de la de la espironolactona) (Tabla 3), lo que se traduce en una menor incidencia

de ginecomastia (0,5%), impotencia (0,1%) e hiperpotasemia (3,4%) que con la espironolactona.

La eplerenona antagoniza las acciones deletéreas de la aldosterona. La aldosterona está implicada en la génesis de la disfunción endotelial, fibrosis, hipertrofia y remodelado cardiaco que aparecen en pacientes con hipertensión arterial, hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardiaca. En ratas unifrectomizadas que reciben sal en el agua de bebida (0,9%), la administración de aldosterona produce: a) lesiones cardíacas, caracterizadas por hipertensión arterial, una marcada fibrosis intersticial y perivascular, hipertrofia, áreas de necrosis e infiltrados de monocitos y macrófagos. Esta fibrosis intersticial y perivascular que deprime, respectivamente, la vasodilatación coronaria y la relajación ventricular, es debida a que la aldosterona estimula directamente la síntesis de colágeno en los fibroblastos cardiacos y disminuye la actividad de la colagenasa-1, una enzima implicada en la degradación del colágeno fibrilar del intersticio cardiaco; b) Proliferación neointimal, hipertrofia de la capa media y necrosis fibrinoide en la pared de las arteriolas coronarias; c) Alteraciones renales: proteinuria, esclerosis glomerular y vascular, necrosis fibrinoide, infiltración leucocitaria y lesiones tubulares; d) Aumenta la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de radicales libres y la expresión de factores de crecimiento (TGFβ) y de marcadores de la inflamación, tales como ciclooxigenasa-2, osteopontina, MCP-1, interleucina 6, proteína C reactiva y molécula de adhesión intracelular-1. Por último, en ratas hipertensas que desarrollan ictus espontáneamente (SPSHR), la aldosterona aumenta la incidencia de ictus, el desarrollo de problemas neurológicos y el tamaño del infarto cerebral, a la vez que acorta la supervivencia de los animales. Así pues, y a diferencia de lo que se creía, la aldosterona juega un importante papel en la patología cardiovascular (Fig. 6).

La eplerenona previene y/o revierte las acciones deletéreas de la aldosterona. Además, disminuye la presión arterial, siendo su acción independiente de la edad, sexo y raza del paciente. Esta acción antihipertensiva se acompaña de una reducción de la hipertrofia y fibrosis cardiacas. En ratas con IM, la eplerenona mejora la función ventricular, disminuyendo la presión y el volúmen telediastólico del ventrículo izquierdo, así como el contenido de colágeno en el área infartada. La acción diurética de la eplerenona es escasa, ya que tan

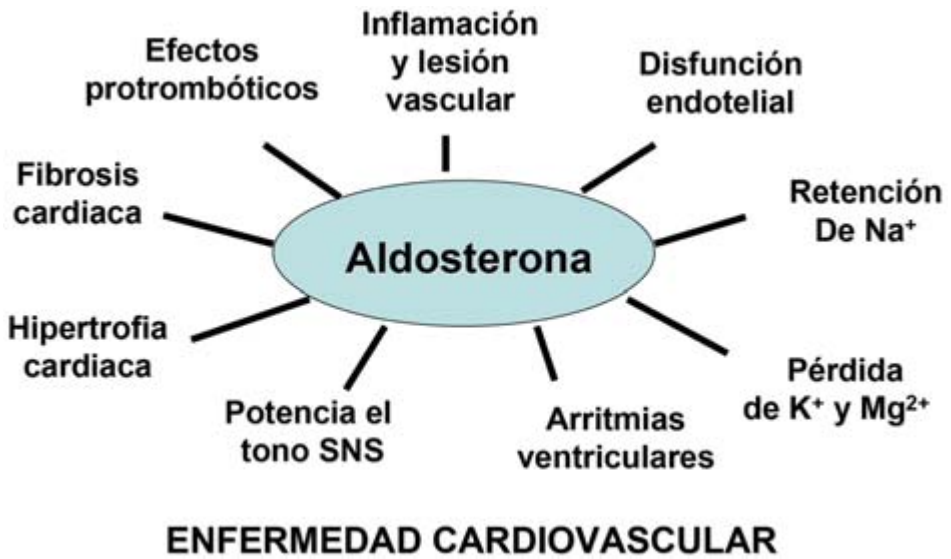


FIGURA 6. *Papel de la aldosterona en la patología cardiovascular.*

sólo elimina un 5% de la fracción de Na filtrada por el glomérulo y su eficacia dependerá del papel que la aldosterona esté jugando en la retención de Na y agua. Sin embargo, la eplerenona no modifica la hemodinámica renal o la velocidad de filtración glomerular.

La aldosterona puede producir arritmias cardíacas por varios mecanismos: a) produce fibrosis intersticial, que disminuye la velocidad de propagación del impulso cardiaco y facilita la aparición de arritmias por reentrada; b) potencia las acciones cardiacas de las catecolaminas, ya que inhibe la recaptación de noradrenalina en los terminales simpáticos desde los que se ha liberado; c) en pacientes con hipertensión arterial o insuficiencia cardiaca, reduce la actividad de los baroreceptores y diminuye la variabilidad de la frecuencia cardiaca, efectos que confirman un aumento del tono simpático cardiaco; d) por último, la aldosterona produce hipopotasemia, un factor que facilita la aparición de arritmias cardiacas. En el estudio EPHESUS (ver más adelante) la eplerenona disminuía la muerte súbita cardiaca, lo que sugiere que el fármaco exhibe propiedades antiarrítmicas. Estas propiedades han sido demostradas para la espironolactona y se traducen en una menor dispersión de la repolarización ventricular.

Efectos de la eplerenona en pacientes con insuficiencia cardiaca. En los pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) disminuye el aclaramiento y aumenta marcadamente la expresión de la CYP11B y, por tanto, la síntesis de aldosterona. Ambas acciones explican el aumento de los niveles plasmáticos de aldosterona, que constituyen un marcador de menor supervivencia en estos pacientes. Los efectos de la eplerenona fueron analizados en el estudio EPHESUS (*Eplerenone post acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study*), realizado en 6.632 pacientes que habían sufrido un IM 3-7 días antes y que presentaban una disfunción ventricular sistólica (fracción de eyección del 33%). En ellos, la administración durante 16 meses de eplerenona (50 mg/día) al tratamiento estándar IECA, antagonisras de los receptores AT1 de la angiotensina II-ARAII, diuréticos, β-bloqueantes, aspirina, fármacos hipolipemiantes y reperfusión coronaria) disminuía significativamente la mortalidad total (15% en la población general y 33% en los que presentaban una menor fracción de eyección ventricular) y cardiovascular (17%), las hospitalizaciones por IC (15%) y la muerte súbita cardiaca (21%). Este estudio ha sido la base para la aprobación de la eplerenona en el tratamiento en pacientes con IC pos-IM.

NUEVOS TRATAMIENTOS DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardíaca (IC) es un grave problema sociosanitario, ya que representa la principal causa de hospitalización en pacientes de más de 65 años y casi el 2% del gasto sanitario anual en España. Su prevalencia sigue aumentando, habiéndose calculado que 50 de los 1.000 millones de personas que viven en los 47 países que forman parte de la Sociedad Europea de Cardiología presentan problemas relacionados con la IC. A pesar de que los ensayos clínicos han demostrado que los IECA, los β-bloqueantes y los antagonistas de los receptores AT1 y de los receptores para los RM han reducido en más de un 35% la mortalidad, el 50% de los pacientes con IC ha fallecido al cabo de cinco años. Este dato indica que la mortalidad a cinco años de la IC es superior a la del cáncer de colon o de próstata en el varón y al de ovario en la mujer y confirma la necesidad de disponer de nuevos fármacos para reducir o retrasar la evolución de la enfermedad.

Tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda

El término IC aguda se utiliza frecuentemente para designar exclusivamente a la IC aguda *de novo* o a la descompensación de la IC crónica, que se caracteriza por presentar signos de congestión pulmonar, incluido el edema pulmonar. El objetivo del tratamiento en estos pacientes es múltiple: a) mejorar los síntomas, disminuyendo la disnea y la fatiga; b) estabilizar la hemodinámica, aumentando el volumen latido y minuto cardíacos a fin de mantener una adecuada perfusión tisular y disminuir la presión capilar pulmonar; c) corregir la oliguria y la azotemia, y d) reducir la morbimortalidad del paciente (evaluada por la necesidad de tratamiento intravenoso con inotrópicos, estancias hospitalarias, rehospitalizaciones y mortalidad.

Con excepción de la digoxina, que reduce la morbilidad, pero no la mortalidad de los pacientes en ritmo sinusal, los restantes fármacos inotrópicos positivos (dopamina, dobutamina, xamoterol, ibopamina, milrinona, enoximona, vesraninona, flosequinán) aumentan su mortalidad. Ello se ha atribuido a su capacidad para aumentar los niveles intracelulares de AMPc, ya sea por incrementar la actividad de la adenilato ciclasa (agonistas β-adrenérgicos) o por inhibir su degradación (inhibidores de la fosfodiesterasa III). Este aumento en los niveles cardíacos de AMPc activa la proteína cinasa A, que fosforila-activa los canales de Ca tipo-L e incrementa la entrada de Ca a su través y la concentración intracelular de Ca libre ($[Ca]_i$). El aumento de la $[Ca]_i$ a nivel de las proteínas contráctiles incrementa la contractilidad, pero también la frecuencia cardíaca (efectos proarrítmicos), las demandas miocárdicas de O_2 (acentúan los procesos isquémicos) y los procesos de necrosis y apoptosis cardíacos que aceleran la progresión de la IC.

Levosimendán

Este fármaco se une al dominio N-terminal de la troponina C (TnC), que es el punto donde se fija el Ca para producir la respuesta contráctil, y prolonga los cambios conformacionales producidos en la TnC al aumentar la $[Ca]_i$ durante la sístole. Ello implica que para un determinado nivel de Ca intracelular el levosimendán acelera la

formación y el número de enlaces cruzados entre actina y miosina, es decir, aumenta la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el Ca. El efecto del levosimendán está regulado por la $[Ca]_i$, de tal forma que, según disminuye ésta durante la diástole, el fármaco se disocia de la TnC; ello explica porqué, a diferencia de otros inotrópicos, el levosimendán no prolonga la relajación ventricular. Además, el levosimendán no modifica el consumo miocárdico de ATP o de O_2, siendo la forma más eficaz, en términos energéticos, de aumentar la contractilidad.

A nivel de la célula muscular lisa vascular, el levosimendán activa los canales de K sensibles a ATP (K_{ATP}). Como consecuencia, hiperpolariza el potencial de membrana celular, disminuye la probabilidad de apertura de los canales de entrada de Ca tipo-L y aumenta la salida de Ca a través del intercambiador Na-Ca; el resultado de estos efectos es una disminución de la $[Ca]_i$ en las células musculares lisas vasculares, que se traduce en una vasodilatación arteriovenosa sistémica, pulmonar y coronaria, que disminuye la pre/poscarga.

En pacientes con IC, el levosimendán produce un aumento dosis-dependiente de la contractilidad cardíaca, el volumen latido y el volumen minuto y disminuye la presión capilar pulmonar, pero no modifica la velocidad de relajación ventricular. Este aumento de la contractilidad es aditivo con el producido por dopamina o dobutamina, pero a diferencia de lo que ocurre con estos inotrópicos, el aumento de la contractilidad ventricular producido por el levosimendán persiste en pacientes tratados con bloqueantes β-adrenérgicos.

En modelos animales de isquemia-reperfusión coronaria, el levosimendán no modifica el consumo miocárdico de O_2, pero aumenta el flujo sanguíneo coronario, un efecto que se antagoniza con glibenclamida, un inhibidor selectivo de los canales K_{ATP}, lo que confirma su importante papel en la vasodilatación coronaria**.** En pacientes sometidos a angioplastia transluminal, el levosimendán también mejora la función del miocardio aturdido, reduciendo el número de segmentos acinéticos.

Administrado por vía i.v. a pacientes con IC sistólica (clase funcional III-IV), el levosimendán mejora las alteraciones hemodinámicas (aumenta el volumen minuto y disminuye la presión capilar pulmonar), la disnea y la fatiga y reduce la estancia hospitalaria y

los reingresos. En el estudio RUSSLAN, realizado en pacientes con IC pos-IM, el levosimendán producía una reducción dosis-dependiente en el riesgo combinado de empeoramiento de la IC y muerte con respecto al grupo tratado con placebo a las 6 y 24 horas de tratamiento; además, la mortalidad total era significativamente menor en el grupo activo que en el placebo, tanto a los 14 días como a los 180 días. El estudio LIDO comparó la administración de levosimendan y dobutamina en pacientes con IC descompensada. Ambos fármacos mejoraban la sintomatología, pero más pacientes alcanzaban el objetivo primario en el grupo tratado con levosimendán que con dobutamina (28% vs 15%). El seguimiento de los pacientes durante seis meses demostró que el levosimendán reducía la mortalidad y aumentaba el número de días que el paciente permanecía fuera del hospital con respecto a los tratados con dobutamina. La incidencia total de reacciones adversas, angina de pecho y taquiarritmias era mayor en el grupo tratado con dobutamina, mientras que el tratado con levosimendán presentaba más episodios de cefaleas, migraña e hipotensión arterial.

FÁRMACOS ANTIARRÍTMICOS

Desde la introducción de la quinidina en 1918 para el tratamiento de las arritmias cardíacas, todos los fármacos antirrítmicos (FAs) se diseñaron sin conocer los cambios que las arritmias producen en el miocardio. Sin embargo, en los últimos años hemos aprendido que las arritmias cardiacas producen importantes cambios en las propiedades eléctricas, morfológicas y contráctiles del corazón, un proceso denominado *remodelado cardíaco*. A corto plazo (minutos/segundos), estos cambios son consecuencia de alteraciones en las concentraciones intracelulares de ciertos iones o en la actividad de ciertos canales y bombas iónicas, mientras que a medio plazo (horas/días), se producen cambios en la expresión de canales iónicos y receptores en la membrana del miocito cardíaco. Estos cambios modifican las propiedades electrofisiológicas cardíacas (*remodelado eléctrico*). A largo plazo (semanas/meses), el remodelado implica cambios estructurales que constituyen el sustrato anatómico que mantiene, en ocasiones, de forma permanente, la arritmia. Por ello, en la actualidad pensamos que el tratamiento antiarrítmico no debe

centrarse, como se había hecho hasta ahora, en bloquear las corrientes iónicas y/o los receptores cardiacos, sino que debe ir dirigido a modificar el sustrato arritmogénico que genera/mantiene la arritmia. Un buen ejemplo de este cambio conceptual es el tratamiento de la fibrilación auricular (FbA).

Fibrilación auricular

La FbA se caracteriza por la presencia en el electrocardiograma de una actividad auricular rápida (> 400 latidos/min.), irregular, de amplitud variable (0,2-0,5 mV) y con posible respuesta ventricular irregular. La FbA es la arritmia más frecuente y la que más consultas clínicas y hospitalizaciones ocasiona. Su prevalencia aumenta con la edad, desde un 1,5% en individuos de 50 años de edad hasta más del 16% en aquéllos de más de 80 años, y este porcentaje aumentará en los próximos años según aumentan las esperanzas de vida de la población. La FbA reduce la tolerancia al ejercicio, el volumen minuto cardíaco y la calidad de vida quintuplica la incidencia de accidentes tromboembólicos y duplica la mortalidad del paciente. Por tanto, la FbA representa un importante problema sanitario no sólo para el cardiólogo, sino para el médico general.

Mecanismos implicados en la fibrilación auricular. En condiciones normales, el impulso generado en el nodo seno-auricular difunde y despolariza las aurículas de forma uniforme en unos 40 milisegundos. En 1962, Gordon Moe propuso que la FbA implicaba la activación continua de la aurícula por múltiples frentes de onda (*multiple wavelets theory*) de longitud y dirección variables. Un concepto importante para comprender la génesis y tratamiento de la FbA es el de longitud de los frentes de onda (LO), que se define como la distancia recorrida por el impulso cardíaco durante el período refractario auricular o PRA (LO = PRA × velocidad de conducción). Para que la activación auricular persista es necesario que el tiempo que el impulso tarda en recorrer el circuito sea superior al tiempo que el tejido auricular tarda en recuperar su excitabilidad, es decir, superior a la duración del PRA. Los frentes de onda que recirculan en la aurícula se extinguen si el tejido auricular se encuentra en periodo refractario absoluto, es decir, inexcitable. Por tanto, el parámetro vulnerable de la FbA es el PRA. La coexistencia de PRA

cortos y de una velocidad de conducción intraauricular lenta, facilita el automantenimiento de la FbA, a la vez que disminuye la posibilidad de que la arritmia pueda revertirse a ritmo sinusal. Aquellas situaciones que acortan el PRA (aumento del tono vagal, hipertiroidismo, dilatación auricular), disminuyen la velocidad de conducción (fibrosis asociada a reumatismo, hipertensión arterial, valvulopatías, insuficiencia cardíaca, envejecimiento, miocarditis) o producen ambos efectos (isquemia, aumento del tono vegetativo), facilitan la aparición de múltiples circuitos de reentrada y mantienen la FbA.

En base a la hipótesis de Moe, durante más de 50 años se pensó que la FbA crónica era una arritmia por reentrada en la que el frente de onda de propagación era generado por las células auriculares que generan potenciales de acción Na-dependiente y por delante encontraba un intervalo excitable muy corto. Por ello, la reversión de la FbA a ritmo sinusal y el mantenimiento de éste se basó en la administración de FAs que bloqueban la corriente de Na (FAs del grupo IA y IC) y/o prolongaban el PRA (Grupo IA y III); en ambos casos, el frente de onda encontraría tejido auricular inexcitable y se suprimiría la arritmia. Sin embargo, todos estos FAs presentan una pobre efectividad clínica (sólo un 50-65% de los pacientes revertidos a ritmo sinusal persisten en el mismo a los seis meses de iniciar el tratamiento) y producen una alta incidencia de reacciones adversas, en particular, taquiarritmias ventriculares mortales. De hecho, los FAs de los grupos IA y III prolongan la duración del potencial de acción (DPA) ventricular y el intervalo QT del electrocardiograma y facilitan la aparición de taquicardias polimórficas ventriculares (*torsades de pointes*) que pueden producir un síncope y muerte súbita si degeneran en fibrilación ventricular. Este es el motivo por el que muchas veces la selección del fármaco viene determinada no por su eficacia, sino por su seguridad (mayor o menor riesgo de inducir arritmias ventriculares).

Nuevos conceptos en la génesis de la fibrilación auricular. La FbA produce importantes cambios en las propiedades electrofisiológicas, estructurales y contráctiles auriculares, denominados *remodelado auricular*, que promueven su propio mantenimiento y recurrencia. La FbA produce un acortamiento no uniforme de la DPA y del PRA a cualquier frecuencia de estimulación y, posteriormente, disminuye la velocidad de conducción intraauricular (*remodelado eléc-*

trico), efectos que facilitan la coexistencia de múltiples frentes de onda y al automantenimiento de la FbA. Al cabo de varias semanas de FbA, se producen cambios estructurales en la aurícula (dilatación, fibrosis, hipertrofia, infiltración grasa, degeneración de las crestas mitocondriales, acúmulo de glucógeno, miolisis, acúmulo de glucógeno, dispersión de cromatina nuclear). Este *remodelado estructural* deprime aún más la velocidad de conducción intraauricular y asociado al remodelado eléctrico, favorece la perpetuación de múltiples frentes de reentrada de la FbA. El remodelado explica: a) por qué la FbA paroxística se hace persistente o permanente con el paso del tiempo, incluso en ausencia de cardiopatía subyacente; b) la facilidad con que la FbA reaparece tras la cardioversión a ritmo sinusal, y c) la pérdida de la eficacia de los FAs para restaurar el ritmo sinusal cuando la FbA persiste durante más de 72 horas.

Existen varias explicaciones de la pobre eficacia de los FAs para restaurar y mantener el ritmo sinusal en pacientes con FbA crónica: a) la FbA reduce la densidad de los canales de Na, Ca y K que constituyen la diana terapéutica de los FAs de los grupos I y III, razón por la que son efectivos para revertir la FbA de reciente comienzo (en las primeras 24-48 horas), pero pierden su efectividad cuando la arritmia persiste; b) Los FAs no modifican el sustrato arritmogénico, por lo que tras la cardioversión de la FbA la duración del PRA persiste acortada durante 1-2 semanas, lo que facilita la recurrencia de la arritmia.

Nuevos fármacos para el tratamiento de la fibrilación auricular. En la Tabla 4 se muestran los fármacos que se encuentran en distintas fases de desarrollo. Se han comercializado algunos que bloquean el componente rápido de la corriente rectificadora tardía de potasio (I_{Kr}). Sin embargo, los bloqueantes de la I_{Kr} presentan dos importantes desventajas: a) prolongan la DPA y el PR a frecuencias lentas, pero este efecto desaparece al aumentar la frecuencia cardíaca; este fenómeno, denominado *reverse use-dependence* disminuye su efectividad en presencia de taquiarritmias; b) Prolongan el intervalo QT del electrocardiograma, facilitando la aparición de *torsades de pointes*. También se han desarollado nuevos FAs que bloquean selectivamente los componentes rápido (I_{Kr}) y/o lento (I_{Ks}) de la corriente rectificadora tardía o que estimulan el componente tardío de la corriente de entrada de Na o que interactúan con varios canales y receptores (Tabla 4).

TABLA 4. *Nuevos fármacos antiarrítmicos*

1.	Fármacos tipo-amiodarona: dronedarona, E-047/1, KB-130015, AT1-2041	
2.	Bloqueantes selectivos de la I_{Kr}: almokalant, dofetilida, ersentilida, risotilida, sematilida	
3.	Fármacos que actúan sobre diversos canales y receptores:	
	Ambasilida	Bloquea I_{Na}, I_{Kur}, $I_{Kr,}$ I_{Ks}, I_{K1} e I_{CaL}
	Azimilida	Bloquea I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Na} e I_{CaL} y receptores b1-adrenérgicos y M2-muscarínicos
	BRL-32872	Bloquea I_{Kr} e I_{CaL}
	Clofilium	Bloquea I_{ks} e I_{to}
	Ersentalida	Bloquea I_{Kr} y receptores β1-adrenérgicos
	Ibutilida	Aumenta I_{Nas} y bloquea I_{Kr}
	Tedisamilo	Bloquea I_{Kr}, I_{to} e I_{KATP}
	Trecetilida	Similar a ibutilida
4.	Fármacos selectivos a nivel auricular:	
•	Bloqueantes selectivos de la I_{Kur}: AVE 0118, RSD1235	
•	Bloqueantes de la I_{KACh}	
5.	Nuevas estrategias terapeúticas dirigidas frente al sustrato arritmogénico	
a)	Modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona	
•	Inhibidores de la enzima de conversión (IECA)	
•	Antagonistas de los receptores AT1 (ARAII)	
•	Antagonistas de la aldosterona: eplerenona, espironolactona	
b)	Bloqueantes β-adrenérgicos: bisoprolol, carvedilol, metoprolol	
c)	Estatinas	

Sin embargo, todos estos FAs son más efectivos para suprimir el flutter (60-80%) que la FbA (30-40%) y más efectivos también para prevenir que para terminar la FbA, hecho que podría explicarse porque la mayoría de ellos prolongan el PRA más a frecuencias cardíacas lentas que a las rápidas. Una nueva estrategia es desarrollar FAs que presenten selectividad auricular. El componente ultrarápido de la corriente rectificadora tardía (I_{Kur}) determina la repolarización auricular, pero no la ventricular. Por tanto, los fármacos que bloquean la I_{Kur} deberían prolongar el PR auricular y podrían revertir a ritmo sinusal la FbA, a la vez que presentarían un mínimo riesgo de producir efectos proarrítmicos ventriculares. En condiciones normales, el bloqueo de la I_{Kur} en un 50% produce una mínima prolongación de la DPA auricular, ya que en estas condiciones la

corriente de entrada de Ca (I_{CaL}) desplaza la fase de meseta o plateau del potencial de acción hacia potenciales más positivos que aquellos a los que la corriente rectificadora tardía (I_K) se activa, lo que acelera la repolarización y así la DPA no se modifica. Sin embargo, la FbA disminuye la densidad de la I_{CaL}, por lo que ahora el bloqueo de la I_{Kur} desplaza el plateau a niveles de potencial de membrana a los que la activación de la I_K es menos marcada, produciéndose una prolongación de la DPA auricular. Recientemente, se ha demostrado que estos fármacos producen una prolongación más marcada de la DPA y del PRA en animales con FbA crónica que en los normales, lo que sugiere que serían más eficaces en la aurícula remodelada.

La corriente de salida de potasio sensible a acetilcolina (I_{KACh}) está presente, fundamentalmente, en la aurícula y el hallazgo de que el carbachol no pueda inducir FbA en ratones knockout para la I_{KACh} sugiere que los bloqueantes específicos de esta corriente podrían suprimir la FbA con mínimo riesgo de producir proarritmia ventricular.

Modificación del sustrato arritmogénico. Dada su reducida eficacia y el riesgo de efectos proarrítmicos de los FAs tradicionales, en la actualidad, el interés se ha desplazado hacia los fármacos capaces de inducir la regresión y/o prevenir el remodelado auricular responsable de la perpetuación de la arritmia, es decir, que inhiban el sustrato arritmogénico de la FbA. El mayor problema que conlleva el desarrollo de estos fármacos es nuestro limitado conocimiento de los mecanismos implicados en este proceso.

En pacientes con FbA crónica se produce una dilatación progresiva y un aumento de la fibrosis auricular. En modelos animales, la dilatación auricular aguda acorta el PRA, mientras que la dilatación crónica despolariza el potencial de membrana, disminuye la velocidad de conducción y aumenta la incidencia de extrasístoles auriculares, a la vez que permite la coexistencia de un mayor número de circuitos de reentrada. Por otro lado, la fibrosis intersticial que aparece en diversos procesos asociados a la FbA (valvulopatías, IC, hipertensión arterial, cardiomiopatías, envejecimiento) separa los haces de miocitos y disminuye la velocidad de conducción, lo que reduce la LO del circuito y facilita el mantenimiento de la FbA. La síntesis de colágeno por los fibroblastos está regulada por diversas vías de señalización. La mejor conocida es la de las cinasas activadas

por mitógenos (MAPKs), que incluye las cinasas activadas por señales extracelulares (Erks 1/2), la p38-MAPK y las c-Jun (JNKs). Diversos agonistas cuyos receptores están acoplados a proteínas G (AII, catecolaminas, endotelina-1), la distensión auricular, las especies reactivas de O_2 y las citocinas proinflamatorias (interleucina-1β, TNFα) activan las MAPK e inducen la diferenciación y activación de los fibroblastos cardiacos.

Inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Los cardiomiocitos expresan todos los componentes del sistema. La estimulación de los receptores AT1 de la AII produce vasodilatación arteriovenosa, aumento del tono simpático central y periférico, liberación de aldosterona y vasopresina y efectos mitogénicos y proliferativos. De hecho, la AII activa las proteínas cinasas C y MAPKs y la expresión de varios factores de crecimiento (TGFβ1, PDGF, FGF) en los cardiomioctios. Como consecuencia, estimula la hipertrofia y fibrosis intersticial y perivascular cardíaca. La AII también modula diversas corrientes iónicas (aumenta la I_{CaL} y la I_{Kr}; inhibe la corriente transitoria de salida de potasio-I_{to} y la I_{Ks}), acortando la DPA y el PRA. Es decir, que la AII participa en el remodelado eléctrico y anatómico de la aurícula. En pacientes con FbA paroxística o crónica aumenta la expresión de la ECA y los niveles de AII; lo mismo sucede en presencia de sobrecarga de presión o de volumen, hipertrofia cardíaca, hipertensión arterial, IM o IC. Además, la dilatación cardíaca aumenta la liberación de AII que, a su vez, estimula los receptores AT1 y activa las MAPKs.

La AII, además, facilita la aparición de arritmias en el miocardio del paciente hipertenso, con IC o cardiopatía isquémica, porque: a) aumenta la frecuencia, la contractilidad, las demandas miocárdicas de O_2, la producción de radicales libres y el tono simpático; b) produce vasoconstricción coronaria e hipopotasemia, y c) exhibe propiedades tróficas sobre los miocitos cardíacos (produce hipertrofia cardíaca) y, directamente o a través de la liberación de aldosterona, aumenta la fibrosis intersticial y perivascular cardíaca que desacopla los miocitos cardíacos y disminuye la velocidad de conducción intracardíaca.

Por todo lo anterior, sería de esperar que los fármacos que inhiben la síntesis de la AII (IECAs) o bloquean sus acciones mediadas a través de los receptores AT1 (ARAII), podrían representar un nue-

vo abordaje del remodelado auricular y una nueva estrategia en el tratamiento y profilaxis de la FbA, particularmente en pacientes con hipertensión arterial, IC o dilatación auricular. Además, dado que la ECA es idéntica a la kininasa II, enzima que inactiva a la bradicinina, los efectos cardioprotectores de los IECA podrían deberse a un aumento en los niveles tisulares de cininas, que inhiben la fibrosis y la hipertrofia auriculares y aumentan la liberación endotelial de factores vasodilatadores y antiproliferativos (NO y prostaciclina).

En un modelo de FbA e IC inducido por sobreestimulación auricular, el enalaprilo disminuye los niveles auriculares de AII y la expresión de los receptores AT1 y de las MAPKs, así como la fibrosis auricular, efectos que se acompañaban de una mejoría de la velocidad de conducción y de la duración de la FbA. Por otro lado, captoprilo y candesartán previenen el acortamiento de la DPA producido por la AII o tras estimulación auricular rápida. En pacientes con hipertensión, IM o IC, los IECA revierten la hipertrofia y fibrosis cardíacas, inhiben el tono simpático y por su acción vasodilatadora arteriovenosa reducen la dilatación auricular; además, disminuyen la presión intraauricular y la frecuencia de los latidos prematuros auriculares y administrados antes de la cardioversión disminuyen las recurrencias de la FbA. También reducen la incidencia de arritmias que aparecen en pacientes con insuficiencia cardíaca moderada-grave (clase funcional III-IV) y la hipertrofia cardíaca (asociada a hipertensión arterial o cardiopatías). De hecho, los IECA disminuyen la reaparición de FbA tras cardioversión eléctrica y reducen su incidencia en pacientes con disfunción ventricular pos-IM. Estas acciones antiarrítmicas serían debidas a la capacidad de los IECA para: a) reducir la tensión parietal cardíaca, las demandas miocárdicas de O_2 (reducen pre y poscarga) y el tono simpático; b) inhibir las acciones tróficas de la AII (disminuyen la hipertrofia miocitaria, la fibrosis y la dilatación cardíaca y mejoran la función auricular); c) actuar como barredores de radicales libres en el miocardio isquémico aumentando los niveles de NO, y d) aumentar la producción de cininas, que incrementan el flujo coronario y la captación de glucosa y reducen la pérdida de K y de ATP por la célula cardíaca durante la isquemia; además, aumentan la liberación de PGI_2 y de NO, que ejercen potentes acciones vasodilatadoras coronarias, antiarrítmicas, antiagregantes plaquetarias y antimitogénicas.

Los efectos beneficiosos de los ARAII son atribuidos al bloqueo de los receptores AT1, a la estimulación de los receptores AT2 (lo que produce efectos vasodilatadores y antiproliferativos) y al bloqueo de diversas corrientes de salida de potasio, lo que prolongaría el PRA y podría suprimir la FbA. Recientemente, se ha demostrado que el irbesartán reduce las recurrencias poscardioversión de la FbA en pacientes tratados con amiodarona y el análisis de diversos estudios realizados en pacientes con IC ha permitido demostrar que losartán (estudio LIFE), valsartán (VALHEFT) y candesartán (CHARM) también reducen la incidencia de FbA en esta población.

Sistema nervioso autónomo. La estimulación rápida auricular se acompaña de una distribución nouniforme de los terminales nerviosos y de los receptores simpáticos y/o auriculares, lo que se traduce en un acortamiento no uniforme del PRA y podría participar en la dilatación, hipertrofia y fibrosis auriculares que facilitan la aparición y/o el mantenimiento de la FbA. Es decir, que el aumento del tono simpático también está implicado en los remodelados eléctrico y estructural auriculares. A su vez, la estimulación β-adrenérgica aumenta la frecuencia de disparo de las células marcapaso auriculares al incrementar la I_{CaL} y la corriente marcapaso (I_f) y acorta el PRA al aumentar la I_{Kur} e I_{Ks} de la corriente rectificadora tardía de potasio. Los bloqueantes β-adrenérgicos controlan la frecuencia cardíaca durante la FbA y pueden ser útiles en algunas formas de FbA paroxística asociadas a un aumento del tono simpático (poscirugía cardíaca, hipertiroidismo). De hecho, disminuyen la incidencia de FbA en pacientes hipertensos.

PRÓTESIS ENDOVASCULARES O STENTS

Muchas de las lesiones aterotrombóticas responsables de los síndromes coronarios agudos (angina inestable, IM), de accidentes cerebrovasculares y de vasculopatías periféricas son debidas a placas de ateroma que ocluyen la luz en un punto muy determinado. Hasta fechas recientes, el tratamiento de estas lesiones consistía en la dilatación de la lesión (angioplastia) o en la colocación de una prótesis metálica endovascular («stent»), que permite dilatar el vaso previamente estenosado y mantener un flujo sanguíneo adecuado y la admi-

nistración de fármacos hipolipemiantes, anticoagulantes, antiagregantes o vasodilatadores. Sin embargo, muchas veces no es posible alcanzar las dosis adecuadas de algunos fármacos, ya que se producen reacciones adversas importantes (hemorragias por anticoagulantes o antiagregantes); por otro lado, en casi un 50% de los pacientes la arteria previamente dilatada vuelva a estrecharse (reestenosis). Una solución a este problema ha sido la reciente introducción de *stents recubiertos* con fármacos que actúan directamente en el punto de la lesión ateromatosa. Ello permite localizar la acción del fármaco en el punto de lesión, evitando sus acciones sistémicas y prevenir la reestenosis.

La construcción de un *stent* liberador de fármacos incorpora al agente farmacológico en un polímero o matriz (*carrier*) que cubre el *stent* metálico y libera de forma controlada dicho fármaco. El *stent* constituye un reservorio ideal para la liberación local del fármaco, proporcionando una distribución uniforme del mismo a nivel de la lesión. El *polímero* o *carrier*, que debe ser bio y vascular compatible, no trombogénico y no corrosivo, proporciona una cinética de liberación constante y controlada del agente a lo largo del tiempo. El fármaco debe ser muy lipofílico y no debe perder su actividad cuando se incorpora en el polímero.

En la actualidad, disponemos de stents recubiertos de diversos fármacos antiproliferativos: a) sirolimus, un macrólido producido por el *Streptomyces hydroscopicus*, con propiedades inmunodepresoras y antiproliferativas. Penetra fácilmente en la célula por difusión a través de la membrana celular. En el citoplasma se une con gran afinidad a una inmunofilina, proteína captadora FK-12 (FK Binding Protein-12, FKBP-12), formando un complejo (FKBP-rapamicin) que se une a mTOR (mammalian target of rapamycin, mTOR), una cinasa relacionada con la PI3K e inhibe su actividad, deteniendo la proliferación de las células musculares lisas vasculares en la etapa tardía de la fase G1. Sin embargo, el sirolimus no interfiere en el crecimiento de las células endoteliales, permitiendo una reendotelización normal del sitio de la lesión; b) El paclitaxel, un taxano que se une de forma reversible a la proción N-terminal de la b-tubulina de los microtúbulos, favoreciendo la polimerización de la tubulina en microtúbulos estables que carecen de la flexibilidad necesaria para participar en la proliferación y la migración celulares; c) La actinomicina D, un antibiótico de la familia de los cromopéptidos, que se fija selectivamente al

ADN e inhibe la síntesis de ARN dirigida por el ADN y produce la rotura de cadenas de ADN, posiblemente por inhibir la topoisomerasa II. También se han utilizado para recubrir los stents análogos de sirolimus (*Everolimus, ABT 578*), batimastat (inhibidor de las MMP), antiinflamatorios (dexametasona), antitrombóticos (heparina), antagonistas de la glicoproteína IIb/IIIa, dadores de óxido nítrico o estradiol, con resultados muy discutibles.

Como cualquier otro tratamiento, el stent también presenta diversas complicaciones: a) *trombosis,* ya que se trata de un cuerpo extraño, pudiendo producirse una interacción entre él y los componentes de la sangre. Para evitarlo se dispone de stents recubiertos con heparina, fibrina, polímeros sintéticos inertes y fosforilcolina o con células endoteliales, algunas manipuladas genéticamente; b) Reestenosis del stent. La proliferación e hiperplasia de la neoíntima persisten con el stent e incluso pueden ser estimuladas por éste. Para prevenir la reestenosis se ha recurrido al recubrimiento del stent con sustancias biodegradables, como el ácido poliláctico al que pueden añadirse agentes farmacológicos, aunque la braquiterapia puede reducir este efecto adverso de la aplicación del stent; c) Hemorragias en el sitio de la punción, desprendimiento y embolización del stent, perforación del vaso, infecciones.

CONCLUSIONES

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de mortalidad en nuestra sociedad y su incidencia seguirá aumentando dada la mayor longevidad de la población y el incremento de factores de riesgo (hipertensión, dislipemia, obesidad, diabetes, sedentarismo, mala alimentación). Ello exige disponer de fármacos no sólo más eficaces, sino más seguros y más fáciles de administrar (no podemos olvidar que se trata de enfermedades crónicas) que los actualmente disponibles. La seguridad es el gran caballo de batalla. Baste con pensar en los fármacos que han sido retirados del mercado por prolongar el intervalo QT del electrocardiograma o el aumento de morbimortalidad cardiovascular producido por los antiarrítmicos, inotrópicos positivos, inhibidores de la COX-2 o algunos nuevos antitumorales, para darnos cuenta de que el papel de los

nuevos fármacos sólo podrá conocerse tras realizar ensayos clínicos controlados a largo plazo, en los que el objetivo primario sea la morbimortalidad cardiovascular.

BIBLIOGRAFÍA

Fármacos hipolipemiantes

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; NAPOLI, C. y LERMAN, A. (2003): Statin effects beyond lipid lowering-are they clinically relevant? *Eur. Heart J*. 24: 225-248.

CHEUNG, B. M.; LAUDER, I. J.; LAU, C. P. y KUMANA, C. R. (2004): Meta-analysis of large randomized controlled trials to evaluate the impact of statins on cardiovascular outcomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 57: 640-651.

Cholesterol Treatment Trialist's Collaborators (2005): Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis od data from 90056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 366: 1267-1278.

DARKES, M.; POOLE, R. y GOA, K. EZETIMIBE (2003): *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 3: 67-76.

DAVIDSON, M. H. y TOTH, P. P. (2004): Comparative effects of lipid-lowering therapies. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 47: 73-104.

DAVIGNON J. (2004): Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 109 (Suppl 1): III 39-43.

DEAN, B. B.; BORENSTEIN, J. E.; HENNING, J. M.; KNIGHT, K. y MERZ, C. N. B. (2004): Can change in HDL-cholesterol reduce cardiovascular risk? *Am. Heart J.* 147: 966-976.

ESC COMMITTEE FOR PRACTICE GUIDELINES (2003): To improve the quality of clinical practice and patient care in Europe. 3rd. Joint European Societies'Task Force on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. 1-26.

LIMA, J.; FONOLLOSA, V. y CHACON, P. (2005): Selective cholesterol absorption inhibition as a new prospect in treatment of hypercholesterolemia. *Med. Clin.* (Barc) 125: 16-23.

MCKENNEY, J. M. (2005): Pharmacologic options for aggressive low-density lipoprotein cholesterol lowering: benefits versus risks. *Am. J. Cardiol*. 96 (4A: 60E-66E).

TOTH, P. (2004): High-density lipoprotein and cardiovascular risk. *Circulation* 109: 1809-1812.

VAN DER STEEG, W. A.; KUIVENHOVEN, J. A.; KLERKX, A. H.; BOEKHOLDT, S. M.; HOVINGH, G. K. y KASTELEIN, J. J. (2004): Role of CETP inhibitors in the treatment of dyslipidemia. *Curr. Opin. Lipidol*. 15: 631-636.

Aldosterona y Eplerenona

GARTHWAITE, S. M. y MCMAHON, E. G. (2004): The evolution of aldosterone antagonists. *Mol. Cell. Endocrinol*. 217: 27-31.

JENNINGS, D. L.; KALUS, J. S. y O'DELL, K. M. (2005): Aldosterone receptor antagonism in heart failure. *Pharmacotherapy*. 25: 1126-1133.

KEATING, G. M. y PLOSKER, G. L. (2004): Eplerenone: a review of its use in left ventricular systolic dysfunction and heart failure after acute myocardial infarction. *Drugs*. 64: 2689-2707.

NÚÑEZ FERNÁNDEZ, L. y TAMARGO MENÉNDEZ, J. L. (2005): Propiedades farmacológicas de la eplerenona. En: EDM: Evaluación del Medicamento. Eplerenona. Ed. Scientific Communication Management, S. L. Madrid. 5-25.

PITT, B.; REMME, W.; ZANNAD, F.; NEATON, J.; MARTINEZ, F.; RONIKER, B.; BITTMAN, R.; HURLEY, S.; KLEIMAN, J. y GATLIN, M. (2003): Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 348: 1309-1321.

ROCHA, R.; RUDOLPH, A. E.; FRIERDICH, G. E.; NACHOWIAK, D. A.; KEKEC, B. K.; BLOMME, E. A. et al. (2002): Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 283: H1802-H1810.

RUDOLPH, A. E.; ROCHA, R. y MCMAHON, E. G. (2004): Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Mol. Cell. Endocrinol*. 217: 229-238.

ROSSI, G.; BOSCARO, M.; RONCONI, V. y FUNDER, J. W. (2005): Aldosterone as a cardiovascular risk factor. *Trends Endocrinol. Metab*. 16: 104-107.

STRUTHERS, A. D. y MACDONALD, T. M. (2004): Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc. Res.* 61: 663-670.

TAMARGO, J.; CABALLERO, R.; GÓMEZ, R. y DELPÓN, E. (2003): Farmacología clínica de las estatinas. *Rev. Esp. Cardiol*. 3 (Supl C): 2C-13C.

Insuficiencia cardiaca aguda y Levosimendan

FOLLATH, F.; CLELAND, J. G.; JUST, H.; PAPP, J. G.; SCHOLZ, H.; PEUHKURINEN, K.; HARJOLA, V. P., et al.: Steering Committee and Investigators of the Levosimendan Infusion versus Dobutamine (LIDO) Study (2002). Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet*. 360: 196-202.

GHEORGHIADE, M.; TEERLINK, J. R. y MEBAZAA, A. (2005): Pharmacology of new agents for acute heart failure syndromes. *Am. J. Cardiol*. 96 (6A): 68G-73G.

INNES, C. A. y WAGSTAFF, A. J. (2003): Levosimendan: a review of its use in the management of acute decompensated heart failure. *Drugs*. 63: 2651-2671.

LÓPEZ-SENDÓN, J. y TAMARGO, J. (2004): Bases y evidencias clínicas de los efectos de los nuevos tratamientos farmacológicos en la insuficiencia cardíaca. *Rev. Esp. Cardiol*. 57: 447-464.

MOISEYEV, V. S.; PODER, P.; ANDREJEVS, N., et al.: RUSSLAN Study Investigators (2002): Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *Eur. Heart J*. 23: 1422-1432.

NIEMINEN, M. S.; BOHM, M.; COWIE, M. R., DREXLER, H.; FILIPPATOS, G. S., JONDEAU, G., et al.: ESC Committe for Practice Guideline (CPG) (2005). Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J*. 26: 384-416.

PITT, B.; REMME, W.; ZANNAD. F.; NEATON, J.; MARTINEZ, F.; RONIKER, B., et al. (2003): Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med*. 348: 1309-1321.

Fibrilación auricular

ALLESIE, M.; BOYDEN, P.; CAMM, J., et al. (2001): Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*. 103: 769-777.

FUSTER, V.; RYDÉN, L. E.; ASINGER, R. W., et al. (2001): ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: Executive summary. *J. Am. Coll. Cardiol*. 38: 1231-1265.

NATTEL, S.; LI, D. y YUE L. (2000): Basic mechanism of atrial fibrillation. Very new insights into very old ideas. *Annu. Rev. Physiol*. 62: 51-77.

NATTEL, S. (2002): New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 415: 219-226.

NATTEL, S.; KHAIRY, P.; ROY, D., et al. (2002): New approaches to atrial fibrillation management: a critical review of a rapidly evolving field. *Drugs. 62*, 2377-2397.

SINGH, B. (1999): Current antiarrhythmic drugs: an overview of mechanisms of action and potential clinical utility. *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. 10: 283-301.

TAMARGO, J.; CABALLERO, R. y DELPÓN, E. (2004): Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Curr. Med. Chem*. 11: 13-28.

TAMARGO, J. (2000): A review: Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. *Jap. J. Pharmacol*. 83: 1-19.

TAMARGO, J. y ALMENDRAL, J. (1999): Pharmacologic Treatment of Arrhythmias. En: Cardiology. Eds. Dalla Volta, S.; Bayés, A.; Brochier, M.; Dienstl, F.; Jezek, V.; Mortensen, S.; Poole-Wilson, P.; Braunwald, E. McGraw-Hill, Londres: 255-262.

Stents

BAVRY, A. A.; KUMBHANI, D. J.; HELTON, T. J. y BHATT, D. L. (2005): What is the risk of stent thrombosis associated with the use of paclitaxel-eluting stents for percutaneous coronary intervention?: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol*. 45: 941-946.

BHARGAVA, B.; KARTHIKEYAN, G. A. S.; ABIZAID, A. S. y MEHRAN, R. (2003): New approaches to preventing restenosis. *Br. Med. J*. 327: 274-279.

GERSHLICK, A. H. (2005): Drug eluting stents in 2005. *Heart*. 91 (Suppl 3): 24-31.

SCHWARTZ, R. S.; CHRONOS, N. A. y VIRMANI, R. (2003): Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *J. Am. Coll. Cardiol*. 44: 1373-1385.

SOUSA, J. E.; SERRUYS, P. W. y COSTA, M. A. (2003): New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: part II. *Circulation* 107: 2383-2389.

TANABE, K.; REGAR, E.; LEE, C. H.; HOYE, A.; VAN DER GIESSEN, W. J. y SERRUYS, P. W. (2004): Local drug delivery using coated stents: new developments and future perspectives. *Curr. Pharm. Des*. 10: 357-367.

WOODS, T. C. y MARKS, A. R. (2004): Drug-eluting stents. *Annu. Rev. Med*. 55: 169-178.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 821-833

Artículo Original

Cholinergic currents in *Xenopus* oocytes transplanted with human brain membranes

LAURA TEXIDÓ, ESTEVE ROS, PIEDAD NAVARRO, JORDI ALEU, JORDI MARSAL & CARLES SOLSONA
Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular.
Departamento de Patología y Terapéutica Experimental.
Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona

ABSTRACT

Cholinergic human brain currents were recorded in *Xenopus laevis* oocytes transplanted with human cerebral membranes from two different zones, the frontal cortex and the hippocampus. The recorded currents were supported by the nicotinic or the muscarinic acetylcholine receptor. We tested the effects of a number of several nicotinic agonists acetylcholine, nicotine and 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide (DMPP), and the nicotinic receptor antagonists a-bungarotoxin and d-tubocurarine on the transplanted oocytes. We detected four kinds of nicotinic current kinetics. The differences in the amplitude and in the total electric charge of the currents elicited by various agonists at a range of holding potentials were not significant, except in the case of DMPP at a holding potential of -90 mV. Our results indicate that α4β2, α3β4 and α7 are the main nicotinic receptors in human brain.

Key words: Human cortex.—Neuronal nicotinic currents.—*Xenopus* oocytes.—Membrane transplant.—Alzheimer.—Brain bank.

RESUMEN

Corrientes colinérgicas en oocitos de *Xenopus* trasplantados con membranas de cerebro humano

Corrientes colinérgicas de cerebro humano fueron registradas en oocitos de *Xenopus laevis* trasplantados con membranas de cerebro humano procedentes de

dos zonas diferentes, la corteza frontal y el hipocampo. Las corrientes registradas fueron activadas por el receptor nicotínico o por el receptor nicotínico o muscarínico de la acetilcolina. Se probaron los efectos de diferentes agonistas nicotínicos como acetilcolina, nicotina y yoduro de 1,1-dimetil-4-fenil-piperazinio (DMPP), y antagonistas del receptor nicotínico como a-bungarotoxina y d-tubocurarina en los oocitos transplantados. Detectamos cuatro clases de cinéticas de corrientes nicotínicas. Las diferencias en la amplitud y en la carga eléctrica total de las corrientes provocadas por varios agonistas en el rango de potencial mantenido no fueron significativas, excepto en el caso del DMPP a un potencial mantenido de -90 mV. Nuestros resultados indican que las formas α4β2, α3β4 y α7 son los principales receptores nicotínicos en el cerebro humano.

Palabras clave: Córtex humano.—Corrientes nicotínicas neuronales.—Oocitos de *Xenopus*.—Trasplante de membrana.—Alzheimer.—Banco de cerebros.

INTRODUCTION

The cholinergic pathways in the central nervous system play a significant role in cognitive and behavioral functions such as learning, memory, arousal, cerebral blood flow and metabolism. Neuronal nicotinic and muscarinic receptors are involved in these functions (1-3).

The neuronal nicotinic acetylcholine receptors are a family of acetylcholine-gated ion channels which has been characterized combining molecular cloning and pharmacology. Several subtypes with a specific pharmacology, physiology and anatomical distribution, have been found. A gene family encoding 11 of these receptors, has been identified, and most of them have been cloned and expressed in transfected cells (4). Two main subunits have been documented: a and b chains. To date 8 types of α and 3 types of β chains have been detected. Mutations in one of the subunit genes account for some pathological conditions such as a specific form of epilepsy or schizophrenia and in neurodegenerative illnesses, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, high affinity neuronal nicotinic acetylcholine receptors sites are reduced (3).

Studies of recombinant neuronal nicotinic receptor expressed in *Xenopus* oocytes show that coexpression of the α and β subunits is needed to form an active receptor with a pentameric structure.

However, expression systems α7, α8 and α9 result in active homo-oligomeric receptors (3, 5). The expression of combinations of distinct mRNA subunits in *Xenopus* oocytes shows the individual pharmacological profiles of the subunit combinations and which makes it possible to identify the type of nicotinic receptor according to its profile (6). The specific combination of the types of subunits determines the pharmacology of these receptors (7).

The presence of distinct subunits in human brain has been established by *in situ* hybridization techniques, but we do not know the combination of the subunits in each native receptor. In addition functional activity, has been tested by expressing the mRNA encoding subunits in *Xenopus* oocytes. Here we assessed the physiology of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor by transplanting membranes obtained from human brain into *Xenopus* oocytes. This technique alowed us to study the pharmacology of native receptors in their original lipid and proteic environment.

MATERIALS AND METHODS

1. Subcellular fractionation protocol in human brain

Frozen brain tissue was obtained from the «Banc de Teixits Neurològics. Serveis Científico-Tècnics. Universitat de Barcelona. Hospital Clínic», at 7 h post-mortem from a 66-year-old male donor with no history of neurological disorder (reference BK360). The samples were from the frontal cortex and hippocampus.

Subcellular fractionation was performed following the method described by Blackstone *et al*. (8). All procedures were performed at 4º C. About 1 g of frozen brain was homogenized 10 times at 600 r.p.m. with a glass-teflon homogenizer (Potter S, B. Braun Biotech International) in 10 volumes with a solution 4 mM HEPES, 1 mM EDTA (pH 7.4) with 2 μg/ml leupeptin, 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 μg/ml aprotinin, 2.5 μg/ml pepstatin. The homogenate was agitated for 30 min and centrifuged at 1000 *g* for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 25000 *g* for 20 min. The resulting sediment was resuspended in the solution plus 0.25 M sucrose and layered onto a discontinuous sucrose gradient

containing 0.8 M/1 M/1.2 M sucrose and centrifuged for 2 h at 65000 *g* in a Beckman SW-28 rotor. A synaptic membrane fraction was yielded at the 1 M/1.2 M sucrose interface, myelin in the floating fraction and a mitochondrial fraction as the pellet. The synaptic plasma membrane fraction was diluted 1/3 in a solution HEPES 10 mM and centrifuged for 30 min at 50000 g. The resulting sediment was resuspended in a HEPES 10 mM, KCl 140 mM (pH 7.4) solution, frozen with liquid nitrogen and stored at –80 ºC until use.

2. Animals and solutions

Mature females of *Xenopus laevis* were purchased from the «Centre d'Elevage des Xenopes» (Montpellier, France), and were anaesthetized by immersion in water containing 0.17 % tricaine. A few lobes were removed from an ovary through a small incision in the abdomen.

Solutions for *Xenopus* oocytes: Barth's solution contained: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.41 mM $CaCl_2$, 0.82 mM $MgSO_4$, 2.40 mM $NaHCO_3$, and 20 mM HEPES at pH 7.4, supplemented with 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. Recording solution: 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, and 10 mM HEPES at pH 7.4. None of the *Xenopus* female donors used in this study exhibited muscarinic acetylcholine receptor currents in their oocytes.

3. Oocyte preparation, membrane transplantation and recording

Oocytes at stages V and VI (9) were removed out and kept at 15-16º C in sterile Barth's solution. Healthy oocytes were microinjected with volumes within 50-100 nl of thawed suspension of human brain membranes (3-10 mg/ml) following Marsal *et al*. (10), by means of an injector (WPI, model A203XVZ). Samples were sonicated prior to injection.

Before recording (3-4 h), oocytes were treated with collagenase type 1A (Sigma) (0.5 mg/ml) for 45-50 min at room temperature to remove the surrounding layers (11). They were then voltage-clamped

with a two-electrode system (Axoclamp-2A, Axon Instruments, USA) 20-48 h after the membrane transplant. Intracellular electrodes (1-3 MW resistance) were filled with 3 M KCl for voltage recording and current injection. The volume of the oocyte recording chamber was 200 µl. Membrane currents were sampled by Lab PC+ (National Instruments, USA) at twice the filter frequency, low-pass filtered at 10 Hz and recorded on a PC using the Whole Cell Analysis v. 2.1. program which was kindly provided by Prof. J. Dempster (Strathclyde University, Scotland, UK). Currents were elicited by challenges of 1-3 mM cholinergic agonist. The interval between consecutive responses was systematically set to 10-12 min (flow rate 6-8 ml. min^{-1}), as we had previously established that this was sufficient to ensure a complete recovery from receptor desensitization. Oocytes from *Xenopus* donors were tested for muscarinic acetylcholine receptors. To ensure the consistency of the response amplitude, three consecutive agonist challenges were applied before changing to other agonist or antagonist.

We tested the effects of the nicotinic agonists, nicotine, acetylcholine, 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide (DMPP), at concentrations from 1 to 3 mM, on the *Xenopus* oocytes transplanted with the human brain membranes. The membranes from frontal cortex were obtained in two independent fractionations. The results were recorded in oocytes from 12 *Xenopus* donors.

4. Measurement and calculations

The amplitude and time constant of responses was measured through Whole Cell Analysis. Statistical analysis was done using SigmaStat 2.0 (SPSS Inc, Chicago, IL), using the one way Anova Test.

5. Drugs

(-)-Nicotine, acetylcholine chloride, 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide (DMPP), α-bungarotoxin and d-tubocurarine chloride were obtained from Sigma, St Louis, MO, USA.

RESULTS

Transplant of human brain membranes, either from cortex or hippocampus, into *Xenopus* oocytes significantly decreased the oocyte resistance ($p < 0.05$); (0.3 ± 0.05 MΩ) (n = 16) vs (0.8 ± 0.2 MΩ) (n = 12) in oocytes injected with H_2O. Usually, after 20-48 h of membrane injection, we recorded an inward current in response to cholinergic agonists in 30-40% of the injected oocytes. When acetylcholine was used some of the responses (between 40-50% of the oocytes tested) were from the muscarinic receptor (Fig. 1a) because the response was of the oscillatory type and remained active for several minutes and was sensitive to atropine (Fig. 1b). In other oocytes we found a non-oscillatory response after perfusing with the nicotinic agonists acetylcholine, or nicotine or DMPP.

We found four kinds of nicotinic currents depending on the agonist applied, Figs. 1 C, D, E, F. In the first kind of response (Fig. 1 C) the current opened fast (τ = 6.9 ± 2.2 s) and was maintained while perfused with the agonist. This kind of current, which was not so usual (8/83 responses) was observed using acetylcholine (7/8 responses) and nicotine (1/8 responses) but not with DMPP. The second kind of current (Fig. 1 D), the most common (53/83 responses) opened slowly (τ = 19.7 ± 4.7 s) and increased until the agonist was washed out (in some cases, we exposed the oocyte to the agonist for 90 s and the inward current increased at a constant rate throughout exposure. A third kind of response (Fig. 1 E, 17/83 responses) exhibited dual kinetics: it started as a fast opening (τ = 8.12 ± 1.4) but then slowed down until the agonist was washed out (τ = 16.2 ± 1.7). Finally, we identified a fourth kind of current (Fig. 1 F) that opened with a τ = 6.4 ± 0.8 s and closed spontaneously before the agonist was washed out. This kind of current was not usual (5/83 responses) and was observed only using DMPP (4/5) and nicotine (1/5).

The total recording time in one oocyte varied from 40 to 90 s. Table 1 summarizes the amplitude of responses obtained at a range of holding potentials, –80, –90, –100 mV. In each holding potential group, the amplitude of the currents was independent of the agonist used, except in the case of DMPP when was measured at –90 mV.

When the membranes were obtained from oocytes injected with hippocampus membranes, we found the same results as described in cerebral cortex, except that no differences between the agonist were detected.

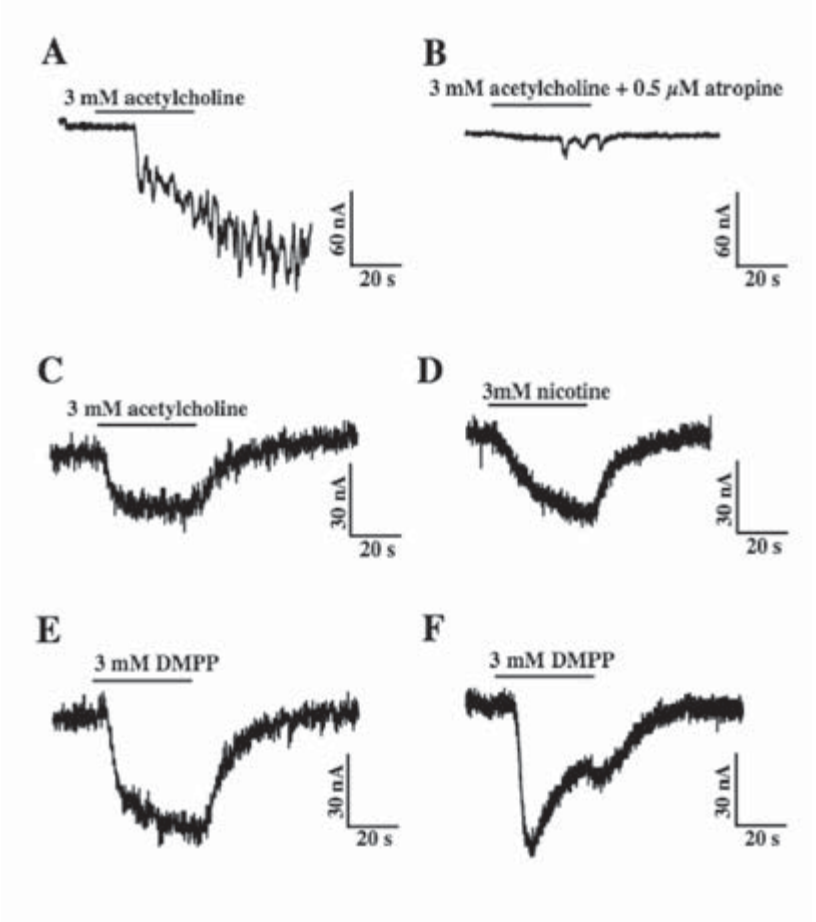


FIGURE 1. *Effects of nicotinic agonists on the size of the currents at a holding potential of –90 mV with an exposure of 40 s. In this case the membranes were from frontal cortex. (A) Muscarinic current induced by 3mM acetylcholine. (B) Muscarinic current inhibited by 0.5 mM atropine. (Current obtained in the same oocyte as point A). (C) Nicotinic current induced by 3 mM acetylcholine. (D) Nicotinic current induced by 3 mM nicotine. (E) Nicotinic current induced by 3 mM DMPP. (F) Nicotinic current induced by 3 mM DMPP, note that in this case the channel closed before the end of exposure to the agonist.*

TABLE 1. *Effects of a range of concentrations of agonist at distinct membrane potentials on the size of the induced currents*

	Amplitude (*nA*)	**Charge (*nQ*)**	***n***
[agonist] (time exposure) at –100mV			
1 mM acetylcholine (40 s) FC	29.5 ± 4.5	440 ± 223	8
1 mM nicotine (40 s) FC	33.8 ± 4.7	736 ± 106	6
1 mM DMPP (40 s) FC	33 ± 4	812 ± 215	5
[agonist] (time exposure) at –90mV			
3mM acetylcholine (40 s) FC	18 ± 2.5 [a]	418 ± 83 [a]	5
3mM nicotine (40 s) FC	25 ± 5 [a]	584 ± 138 [a]	6
3mM DMPP (40 s) FC	47 ± 10[a,b]	1094 ± 206[a,b]	6
[agonist] (time exposure) at –80mV			
3mM acetylcholine (30 s) FC	8 ± 5	113.5 ± 78.5	2
3mM nicotine (30 s) FC	15 ± 2	271 ± 79	4
3mM DMPP (30 s) FC	15 ± 4[b]	295 ± 142[,b]	4
[agonist] (time exposure) at –90mV			
3mM acetylcholine (30 s) H	24 ± 10	207 ± 28	3
3mM nicotine (30 s) H	23 ± 2	522 ± 79	3
3mM DMPP (30 s) H	22 ± 6	253 ± 103	2

FC = frontal cortex, H=hippocampus.

The values are in amplitude nA and in nQ area, total surface under the profile of the current. Results are presented as mean ± S.E.M, differences between values[a] and between values[b] were significant $p < 0.05$.

The nicotinic antagonists, α-bungarotoxin (10 nM) and d-tubocurarine chloride (10 μM), had an inhibitory effect on the currents reducing their size (Fig. 2 and Table 2). Both α-bungarotoxin and d-tubocurarine antagonize the effect of acetylcholine, nicotine and DMPP.

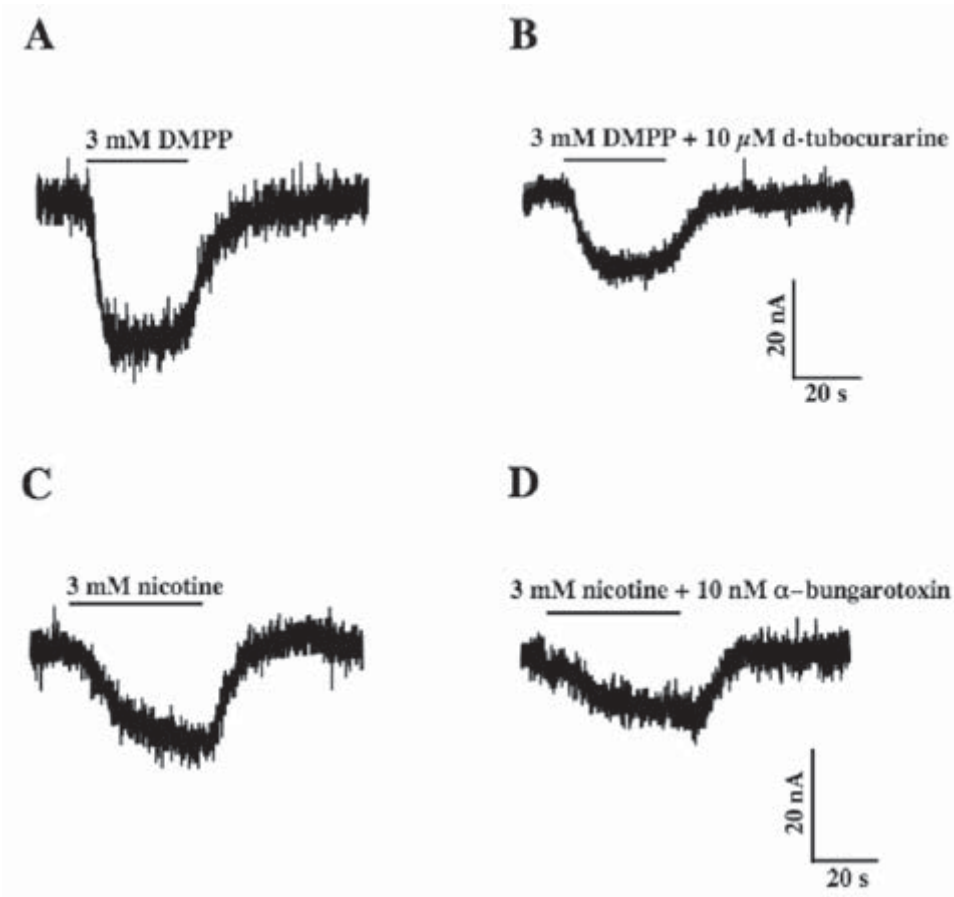


FIGURE 2. *Effects of nicotinic antagonists on the currents induced by nicotinic agonists. (A) Current induced by 3 mM DMPP. (B) Current induced by 3 mM DMPP with the presence of d-tubocurarine (10 μM) 1 min before the exposure to DMPP and during this exposure. (C) Current induced by 3 mM nicotine. (D) Current induced by 3 mM nicotine with the presence of α-bungarotoxin (10 nM) 1 min before the exposure to nicotine and during exposure.*

TABLE 2. *Effects of the aplication of antagonists in the presence of agonists. Results are in % of inhibition*

Agonist / agonist+antagonist	Amplitude (% inhib.)
FRONTAL CORTEX	
nicotine/nicotine+d-tubocurarine	42 ± 4 n = 8
DMPP/DMPP+a-bungarotoxin	42 ± 4 n = 3
DMPP/DMPP+d-tubocurarine	43 ± 1 n = 3
HIPPOCAMPUS	
acetylcholine/acetylcholine+d-tubocurarine	29 n = 1
Nicotine/nicotine+d-tubocurarine	26 ± 2 n = 2

d-tubocurarine was at a concentration of 10 μM and α-bungarotoxin at a concentration of 10 nM

DISCUSSION

In the human brain most high affinity neuronal nicotinic acetylcholine receptors seem to comprise an arrangement of α4β2 subunits. Combinations with α3 subunits and homomeric α7 constitute the other major part. However various combinations of α2, α3, α5, α6 and β2 and β4 subunits are also coexpressed to form heteromeric receptors (3, 12-14).

In previous studies that have involved injecting human mRNA to *Xenopus* oocytes, recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors displayed differential sensitivity to nicotinic agonists and antagonists and distinct kinetics, depending on the subunit combinations and on the concentration of agonist used. The sensitivity to the antagonists also differed depending on combination of the subunits present in the receptor (3, 6).

We must point out that native human nicotinic acetylcholine receptors are still active 7 hours after death, the brain extraction and even after freezing and thawing. Here we recorded small currents by perfusing acetylcholine over oocytes transplanted with human brain membranes. The small amplitude of the currents may be due to: a small number of receptors incorporated into the *Xenopus* oocyte or to the poorly represented nicotinic receptors in the zones

of human brain where membranes were obtained (3). In some cases, using acetylcholine, we recorded currents from human muscarinic receptors with the characteristic oscillatory profile for several minutes because this profile was caused by fluctuations in intracellular IP4 which led the opening of calcium activated chloride channels (15).

The oocytes in which were stimulated by all the agonists tested were taken as the most representative, with respect to sensitivity to the agonists. Generally, we recorded differences in the effect of these agonists in the same oocyte but did not find any significant difference between the means. However, with DMPP at a holding potential of –90 mV, the difference was significant and may be due to a greater incorporation of α7 or α3β4 receptors, in which DMPP is the most potent agonist (6).

The distinct kinetics of the currents detected can be explained by the predominant presence of some subunit combinations and to the concentration of the agonist dose used. Currents elicited in α3β4 and α3β2 decay substantially faster than those recorded in α2β4 or α4β4, and the currents elicited by the α7 receptor are faster that any other heteromeric combination (6). The currents that we recorded could be the addition of the distinct kinds of receptor currents, in which, in some cases, the prevalence of one of the receptors determines the profile or the kinetics of the current. We found that sensitivity to a-bungarotoxin was about 40%, a result which indicated the presence of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor α7 in the sample, the only neuronal subunit with sensitivity to a-bungarotoxin. Sensitivity to d-tubocurarine was variable, with mean inhibition between 26% and 43% of the current induced by the agonist, depending on the brain zone from where membranes were obtained. These results indicate the major presence of α4β2 and α7 subunits in the frontal cortex sample, because these receptors are sensitive to d-tubocurarine of 50% (6). In the currents obtained from hippocampus this inhibition was lower.

In conclusion, active nicotinic receptors survive for at least several hours after death. The profiles of the currents of transplanted human brain nicotinic receptors are very similar to those recorded from oocytes expressing human *mRNA*, indicating that the latter model is

similar to the actual currents in human brain, and not merely a chimeric combination of different receptor subunits. Our results, therefore reinforce the usefulness of *Xenopus* oocytes expressing human nicotinic mRNA as a tool for pharmacological research to design drugs to ameliorate the symptoms in Alzheimer patients. The pharmacology of the nicotinic current recorded reveals that the main native combination of subunits corresponds to α4β2, α3β4 and α7 receptors which is consistent with the major presence of nicotinic receptors in human brain (12-14).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by DGESIC from the Spanish Government, CIRIT from the Generalitat de Catalunya and the Fundació La Marató de TV3. We are indebted to the Banc de Teixits Neurològics (Brain Bank) of the Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona, for human brain sample. We also thank SAL of the Universitat de Barcelona for linguistic help. The Win Whole Cell analysis 3.0.2 program was kindly provided by Prof. Dempster (Strathclyde University, Scotland, UK). P.N. received a fellowship from the Fundació August Pi i Sunyer.

REFERENCES

(1) LINDSTRÖM, J. (1997): Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol. Neurobiol*. 15: 193-222.
(2) LEVIN, E. D. & SIMON, B. B. (1998): Nicotinic acetylcholine involvment in cognitive functions in animals. *Psychopharmacology* (Berl) 138: 217-230.
(3) PATERSON, D. & NORDBERG, A. (2000): Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol*. 61: 75-111.
(4) GOTTI, C.; FORNASARI, D. & CLEMENTI, F. (1997): Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. neurobiol*. 53: 199-237.
(5) MCGEHEE, D. S. & ROLE, L. W. (1995): Physiological diversity of nicotinic ACh receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 521-546.
(6) CHÁVEZ-NORIEGA, L. E.; CRONA, J. H.; WASHBURN, M. S.; URRUTIA, A.; ELLIOTT, K. J. & JOHNSON, E. C. (1997): Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic ACh receptors hα2β2, hα2β4, hα3β2, hα3β4. hα4β2, hα4β4 and hα7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 280: 346-356.

(7) COLQUHOUN, L. M. & PATRICK, J. W. (1997): α3, β2, and β4 form heterotrimeric neuronal nicotinic ACh receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem*. 69: 2355-2362.
(8) BLACKSTONE, C. D.; MOSS, S. J.; MARTIN, L. J., LEVEY, A. I.; PRICE, D. L. & HUGANIR, R. L. (1992): Biochemical characterization and localization of a non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor in rat brain. *J. Neurochem*. 58: 1118-1126.
(9) DUMONT, J. N. (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-179.
(10) MARSAL, J.; TIGYI, G. & MILEDI, R. (1995): Incorporation of ACh receptors and Cl^- channels in *Xenopus* oocytes injected with *Torpedo* electroplaque membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 92: 5224-5228.
(11) MILEDI, R. & WOODWARD, R. M. (1989): Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J. Physiol*. 416: 601-621.
(12) WHITING, P.; ESCH, F.; SHIMASAKI, S. & LINDSTROM, J. (1987): Neuronal nicotinic ACh receptor beta-subunit is coded for by the cDNA clone alpha4. *FEBS lett*. 219: 459-463.
(13) FLORES, C. M.; ROGERS, S. W.; PABREZA, L. A.; WOLFE, B. B. & KELLAR, K. J. (1992): A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol. Pharmacol*. 41: 31-37.
(14) ZOLI, M.; LENA, C.; PICCIOTTO, M. R. & CHANGEUX, J. P. (1998): Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J. Neurosci.* 18: 4461-4472.
(15) MATUTE, C.; ARELLANO, R. O.; CONDE-GUERRI, B. & MILEDI, R. (1992): mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 89: 3399-3403.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 835-848

Artículo Original

Relación estructura-fotoestabilidad y fototoxicidad de fluoroquinolonas

ERNESTO FERNÁNDEZ y GEORGINA SÁNCHEZ
Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso Chile

RESUMEN

Las quinolonas constituyen una familia de antibióticos de amplio uso en la actualidad, debido a su gran eficacia clínica en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, urinario, tejidos blandos y enfermedades de transmisión sexual. De acuerdo a su estructura base se pueden clasificar en quinolonas naftiridínicas (enoxacino y ácido nalidíxico), quinolínicas (ciprofloxacino, norfloxacino, ácido oxolínico, rosoxacino) y pirimido-pirimidinicas (ácido pipemídico). Las quinolonas se caracterizan por presentar reacciones de fotosensibilidad y fotolabilidad. El ácido nalidíxico, quinolona de primera generación, presenta reacciones de fototoxicidad, evaluadas en el modelo del glóbulo rojo y en cultivos celulares. El ácido nalidíxico, exento del sustituyente piperazínico presenta una fotolabilidad disminuida.

Las fluoroquinolonas, a diferencia del ácido nalidíxico, presentan un anillo piperazínico o metil piperazínico en posición 7, incorporado con el fin de mejorar las propiedades antibacterianas. En este trabajo se investiga la influencia del anillo piperazínico en posición 7 sobre la fotolabilidad y fototoxicidad, demostrándose que las fluoroquinolonas que poseen este sustituyente presentan una fotolabilidad aumentada y una fototoxicidad disminuída, en relación a quinolonas carentes de éste grupo. Es probable que la fotodegradación de quinolonas transcurra mediante un mecanismo radicalario, con la pérdida del grupo carboxílico.

Palabras clave: Fluoroquinolonas.—Fototoxicidad.—Fotodegradación.

ABSTRACT

Structure-photostability and phototoxicity relationship in fluoroquinolones

Quinolones constitute a large class of synthetic antimicrobial agents that are highly effective in the treatment of respiratory, urinary, sexually transmitted

diseases and soft tissue infection. In agreement with his structure the quinolones can be classified into naftaridines (enoxacin and nalidixic acid), quinolines (ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, roxosacin) and pyrid-pyrimidin (pipemidic acid). Some quinolones may undergo photodegradation reactions. On the other hand, quinolones can induce cutaneous photosensitivity reactions.and photolability as well.

Nalidixic acid, a first quinolone generation, may undergo phototoxic effects on the red blood cells and in cell culture. Nalidixic acid, which has not the piperazine group in position 7, exhibit a moderated photolability. The fluoroquinolones as oppossed to nalidixic acid have a piperazine ring in position 7. We investigated the influence of the piperazine ring on the phototoxicity and photolability of several quinolones. We demonstrated that the fluoroquinolones with piperazinic group present higher photolability and less phototoxicity .It is possible that the photodegradation of quinolones takes place through a radical pathway, with the loss of a carboxylic acid group.

Key words: Fluoroquinolones.—Phototoxicity.—Photodegradation.

INTRODUCCIÓN

Las quinolonas son antimicrobianos de amplio uso en la actualidad, debido a su gran eficacia clínica en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, urinario, tejidos blandos y enfermedades de transmisión sexual (1-3). Su actividad antimicrobiana está estrechamente relacionada a la estructura porción γ-piridona-ß-carboxílica, la cual inhibe a la enzima DNA-girasa, enzima responsable del super-enrollamiento negativo del DNA bacteriano y por lo tanto de la supervivencia de los micro-organismos (4, 5). De acuerdo a su estructura base se pueden clasificar en quinolonas naftiridínicas (enoxacino y ácido nalidíxico), quinolínicas (ciprofloxacino, norfloxacino, ácido oxolínico, rosoxacino, ofloxacino y Moxifloxacino) y pirimido-pirimidinicas (ácido pipemídico) (6).

Las quinolonas de segunda generación (norfloxacino, ciprofloxacino, enoxacino, lomefloxacino, ofloxacino) mejoran su espectro de acción y farmacocinética por medio de modificaciones estructurales, como la introducción de un anillo piperazínico en posición 7, entre otras, lo que permite una mayor concentración en el sitio de acción (7, 8). Entre las quinolonas de tercera generación se encuentra el ofloxacino y moxifloxacino (Fig. 1). La presencia de un grupo metoxilo en posición C-8 se ha asociado también con una menor ten-

dencia al desarrollo de resistencias en estudios con S. aureus (9). Además la sustitución de un hidrógeno por un flúor en posición 6 aumenta de 10 a 100 veces su capacidad de inhibición de la enzima DNA girasa (8, 10, 11). Las quinolonas se caracterizan por presentar reacciones de fotosensibilidad (12-14) y fotolabilidad (15).

El ácido nalidíxico es una quinolona de primera generación que presenta una fototolabilidad disminuida, pero que al ser irradiada con todo el arco de una lámpara de Hg se fotoliza, dando origen a fotoproductos que eventualmente producirían reacciones fototóxicas (16, 17). Las fluoroquinolonas pueden experimentar reacciones

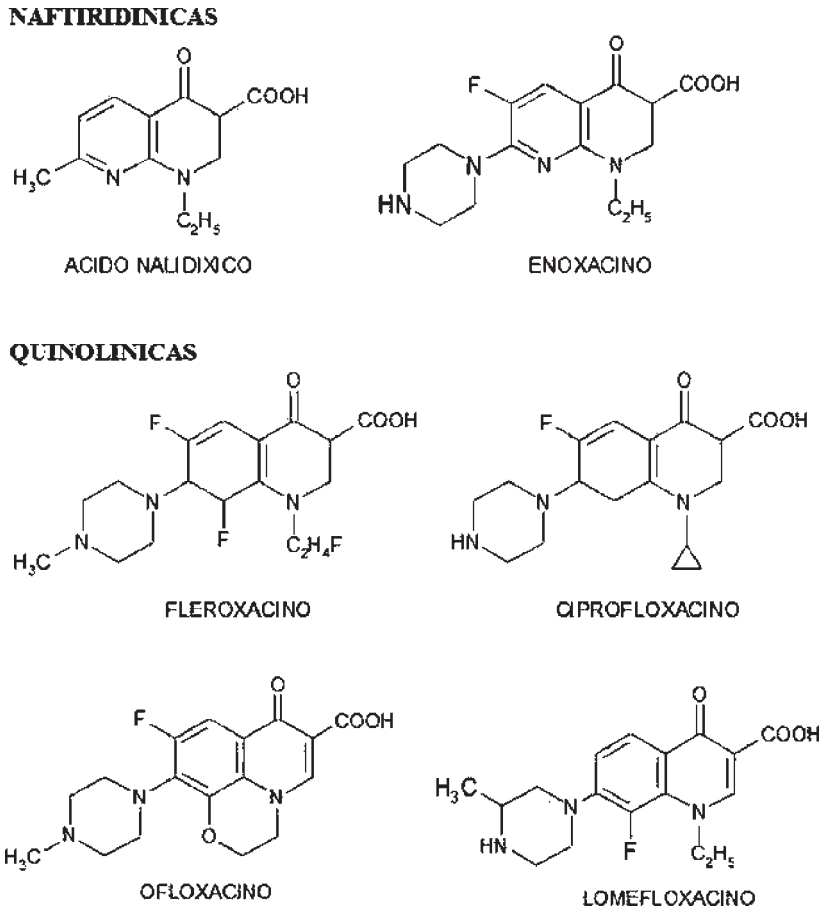


FIGURA 1. *Estructuras de quinolonas.*

fotoquímicas que conducen a la pérdida de flúor (18-21) y procesos que involucran la formación de especies radicalarias.

Es probable que la fotodegradación de las quinolonas transcurra mediante un mecanismo radicalario (22), produciéndose la pérdida del grupo carboxílico en posición orto al carbonilo, mecanismo similar al propuesto por Detzer para la descomposición térmica de ácido nalidíxico (23). La decarboxilación por efecto de la luz ha sido demostrada en derivados aril acéticos (24), en ácidos α-ceto carboxílicos (25) y en el ácido nalidíxico, quinolona naftiridínica que presenta un grupo metilo en posición 7 (22, 24, 26). En el caso del ácido nalidíxico, los fotoproductos (ácido nalidíxico decarboxilado y dímero) fueron aislados por técnicas cromatográficas e identificados por sus propiedades espectrales (22).

Hasta la fecha se han descrito tres tipos de procesos con respecto al mecanismo molecular de los fenómenos de fototoxicidad, dos dependientes de oxígeno y uno independiente de oxígeno (27). Las reacciones dependientes de oxígeno transcurren mediante el mecanismo tipo I generando radicales oxigenados como el anión superóxido y radical hidroxilo (28-30) o mediante el mecanismo tipo II en el cual la molécula excitada en un estado singulete transfiere el exceso de energía al oxígeno triplete, produciendo la especie oxígeno singlete, altamente reactiva. Estos productos originados de los procesos fotodinámicos ejercen daños sobre las membranas celulares al reaccionar con la porción aminoacídica de las proteínas y lípidos estructurales (lipoperoxidación) con las consecuentes alteraciones de la permeabilidad de la membrana y muerte celular entre otros (29-32).

El daño fototóxico de algunas quinolonas, como el ácido nalidíxico, está mediado por la especie radicalaria oxígeno singlete ($^1O_2$). Las fluoroquinolonas que presentan rendimientos cuánticos (Φ) de formación de $^1O_2$ bajos, poseen en posición 7 un anillo piperazínico (33), tal es el caso de Ciprofloxacino Φ 0.04, lomefloxacino Φ 0.016, norfloxacino Φ 0.017, y ofloxacino Φ 0.007. En cambio la flumaquina que carece de este anillo piperazínico, presenta un Φ 0.56.

En el presente trabajo se exponen los resultados sobre las propiedades fotosensibilizantes y fotolabilidad de las fluoroquinolonas

enoxacino, ciprofloxacino lomefloxacino, fleroxacino, y ofloxacino, comparándola con la quinolona naftaridínica ácido nalidíxico. Se discute un posible mecanismo que relaciona la estructura, la estabilidad y la fototoxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas: Enoxacino (Laboratorio Parke Davis, Chile) Lomefloxacino (Laboratorio Roche, Chile), Fleroxacino (Laboratorio Roche, Suiza), Ácido Nalidixico y Ciprofloxacino (Laboratorio Chile, Chile), Ofloxacino (Laboratorio Hoechst, España).

Reactivos: Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Fuente de irradiación: Se empleó un Fotorreactor MVL, equipado con 12 lámparas, que emiten luz UV-A, con una banda centrada a λ 350 nm. Se usó una irradiancia de 0,32 mW/cm^2. Soluciones de las drogas en estudio (10^{-5} M) fueron irradiadas en cubetas de cuarzo. Las cinéticas de fotodegradación se determinaron en condiciones atmosféricas y también en presencia de O_2 y N_2 por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los cálculos de rendimiento cuántico y espectros de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Shimatzu RF-350.

Estudios de fototoxicidad: Se utilizó el test de fotohemólisis (34). Los estudios de fototoxicidad se realizaron utilizando el modelo del glóbulo rojo.

RESULTADOS

Parámetros fotofísicos y fotoquímicos

En la Tabla 1 se presentan los máximos de absorbancia y de emisión y los rendimientos cuánticos de consumo Φc y Φ_F de las seis quinolonas en estudio enoxacino, lomefloxacino, fleroxacino, ácido nalidíxico, ofloxacino y ciprofloxacino.

TABLA 1. *Parámetros fotofísicos y fotoquímicos de quinolonas (Soluciones de drogas en PBS pH 7.4)*

	Enoxacino (1)	Lomefloxacino (2)	Fleroxacino (3)	Ác. Nalidíxico (4)	Ofloxacino (5)	Ciprofloxacino (6)
$\lambda_{abs.max\ no\ irra\ (nm)}$	264 y 336-348	284.5 y 321	279.5 y 325.5	258 y 335	287 y 332	340
$\lambda_{emisión.max}$	390	420	420	375	460	418
ϕ_F	$5{,}3 \times 10^{-3}$	$1{,}9 \times 10^{-3}$	$2{,}92 \times 10^{-2}$	0,08 ± 0,017	0,102	0,26 ± 0,02
ϕ_C	0,28 (a)	0,89 (b)	0,473 (c)	0,028 (d)	0,1 (e)	0,200 (f)

Irradiancia: a) $9{,}5 \times 10^{-10}$; b) $2{,}6 \times 10^{-9}$; c) $5{,}7 \times 10^{-9}$; d) $2{,}4 \times 10^{-4}$; e) $5{,}9 \times 10^{-9}$; f) $5{,}0 \times 10^{-9}$ (Einstein s^{-1}).

Cinética de fotoestabilidad de quinolonas

En la Tabla 2 se presentan las cinéticas de fotoestabilidad de las quinolonas en estudio, en presencia y ausencia de oxígeno.

TABLA 2. *Cinética de fotoestabilidad de quinolonas (Soluciones de drogas en PBS pH 7,4)*

	Enoxacino (1)	Lomefloxacino (2)	Fleroxacino (3)	Ác. Nalidíxico (4)	Ofloxacino (5)	Ciprofloxacino (6)
k atm ($.s^{-1}$)	$2{,}4 \times 10^{-3}$ ± $1{,}0 \times 10^{-4}$	$8{,}6 \times 10^{-3}$ ± $5{,}31 \times 10^{-4}$	$2{,}05 \times 10^{-4}$ ± $1{,}5 \times 10^{-3}$	$1{,}7 \times 10^{-4}$	$2{,}93 \times 10^{-3}$ ± 3×10^{-5}	$4{,}107 \times 10^{-3}$ ± 2×10^{-4}
$k0_2$ (s^{-1})	ND	$9{,}8 \times 10^{-3}$ ± $3{,}1 \times 10^{-4}$	$2{,}24 \times 10^{-2}$ ± $3{,}65 \times 10^{-3}$	ND	$2{,}80 \times 10^{-3}$ ± 2×10^{-4}	ND
kN_2 (s^{-1})	$2{,}2 \times 10^{-3}$ ± $5{,}47 \times 10^{-4}$	$5{,}3 \times 10^{-3}$ ± 4×10^{-4}	$2{,}03 \times 10^{-2}$ ± $6{,}24 \times 10^{-3}$	ND	$2{,}50 \times 10^{-3}$ ± $2{,}5 \times 10^{-3}$	ND
KD_20	$2{,}1 \times 10^{-3}$ ± $2{,}4 \times 10^{-4}$	$3{,}3 \times 10^{-2}$ ± $1{,}1 \times 10^{-4}$	ND	ND	$2{,}0 \times 10^{-3}$ ± 1×10^{-4}	ND

Concentración quinolonas (1) Enoxacino = 2×10^{-4} M; (2) Lomefloxacino = 1×10^{-4} M; (3) Fleroxacino = 2×10^{-5} M; (4) Ácido Nalidíxico = 1×10^{-4}; (5) Ofloxacino = 2×10^{-5} M; (6) Ciprofloxacino = 1×10^{-4} M.

El pH también influye en el proceso fotodegradativo de la quinolonas, como vemos en la cinética de fotodegradación de la quinolona enoxacino (Tabla 3).

TABLA 3. *Cinética de estabilidad de Enoxacino en función del pH*

pH	% droga inalterada tiempo 0	% droga inalterada 5 min. irradiación	% droga inalterada 10 min. irradiación
4	100	95,97	92,95
7,4	100	63,49	61,30
8,0	100	56,52	50,36
10	100	84,22	—

ESTUDIOS DE FOTOTOXICIDAD DE QUINOLONAS

En la Tabla 4 se presentan los estudios de hemólisis de las quinolonas en presencia y ausencia de luz.

TABLA 4. *Fototoxicidad en glóbulos rojos*

	Enoxacino (1)	Lomefloxacino (2)	Fleroxacino (3)	Ác. Nalidíxico (4)	Ofloxacino (5)
Ensayo Hemolítico (%)	0,29	3,1	0,0 ± 0,0	0,21	0,0
Ensayo Hemolítico (irradiado)	1,11	6,1	1,18 ± 0,07	7,3	1,18 ± 0,01
Fotohemólisis (atmósfera)	0,49	7,3	1,35 ± 0,11	44	2,95 ± 0,11
Fotohemólisis (con N2)	0,0	—	1,32 ± 0,10	1,8	2,85 ± 0,19

DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 1, las quinolonas presentan un espectro de absorción con dos bandas centradas a 264 y 336-348 correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ respectivamente (Fig. 2). Esta similitud espectral se asocia a la porción γ piridona β carboxílica, presentes en todas las estructuras quinolónicas.

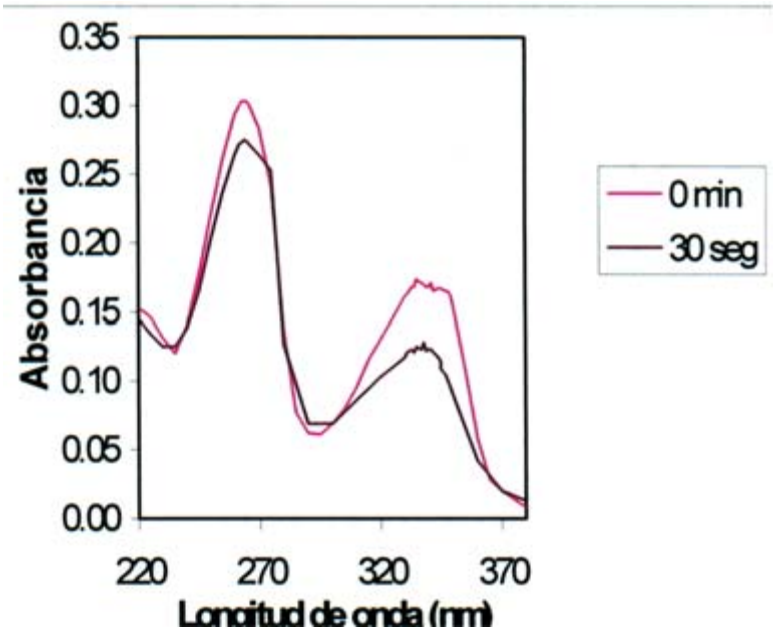


FIGURA 2. *Espectro de absorción de enoxacino no irradiado e irradiado por 30 seg.*

Al irradiar soluciones de las quinolonas las bandas permanecen sin variación a excepción del hombro a 348 nm el que desaparece. La desaparición de este hombro en el espectro de absorción por efecto de la irradiación podría indicar pérdida del grupo carboxilo (Fig. 2). La formación del radical decarboxilado se ha observado en ácidos aril acéticos (35). En algunas quinolonas también se ha comprobado la pérdida de este grupo por efecto de la irradiación (26), pérdida que se ve facilitada por la presencia de sustituyentes dadores de electrones. El espectro de absorción en alcohol también presentó dos bandas, no observándose ningún hombro en la banda $n \rightarrow \pi^*$. Esto nos indicaría que, dado los rasgos estructurales de estos fármacos, en estas condiciones podrían formar un enlace intramolecular entre el grupo carbonilo y el COOH (Fig. 3). Este mismo enlace intramolecular ha sido propuesto en soluciones de pH ácido, ya que derivados carboxílicos que carecen del grupo cetónico adyacente son incapaces de formar este enlace (36).

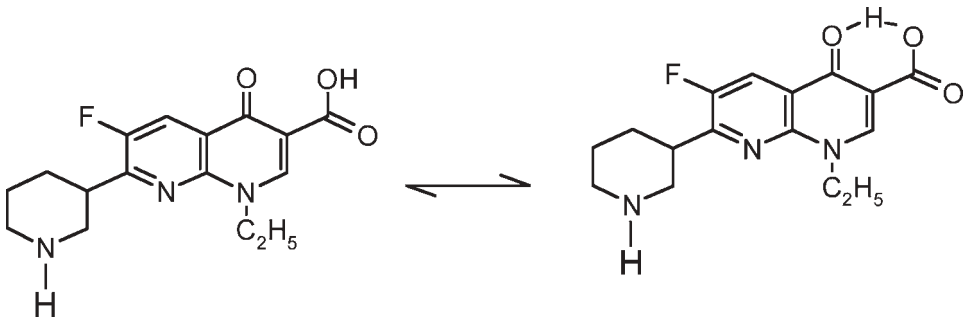


FIGURA 3. *Formación de puente de hidrógeno intramolecular en enoxacino.*

Los espectros de absorción de las quinolonas varían en función del pH, observándose un desplazamiento hipsocrómico a pH ácidos y un desplazamiento batocrómico a pH básicos. Es así como al irradiar soluciones de enoxacino en PBS, a diferentes valores de pH se observa que el porcentaje de droga inalterada a los 5 minutos de irradiación es de 56,52 a pH 8; 63,5 a pH 7,4 y 95,97 a pH 4. Esto estaría indicando un equilibrio zwitterionico en la estructura de estos fármacos (Fig. 4). El pH determina la existencia o ausencia de la forma aniónica de las quinolonas. A pH 8, la estructura predominante es la aniónica, estructura química más lábil a la acción de la luz (37).

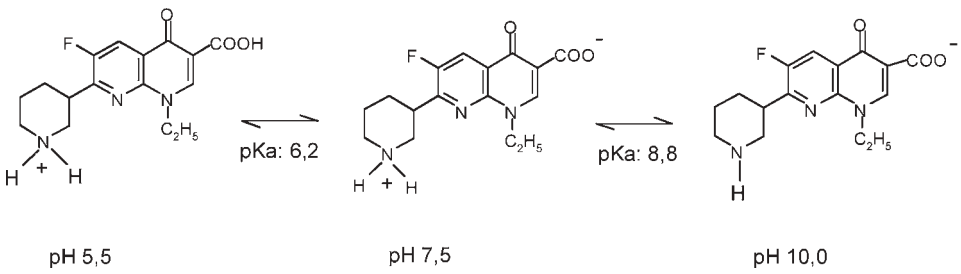


FIGURA 4. *Estructura zwitter ion de enoxacino.*

Luego podemos sostener que el grado de decarboxilación es dependiente de la estructura predominante que presente el fármaco y ésta, a su vez, es dependiente del pH de la solución.

A partir de los valores de la Tabla 1 podemos observar que a excepción de ofloxacino y ciprofloxacino las demás quinolonas presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia bajos, lo que estaría indicando para estas quinolonas un decaimiento principalmente por una vía fotolítica o por termalización. La emisión también varía en función del pH, de acuerdo a los valores de pKa determinados para el enoxacino la emisión alcanza un valor máximo en el punto isoelectrico (pH 7,5). A valores de pK bajo o sobre el punto isoeléctrico las interacciones ión dipolo hacen variar la intensidad de la emisión fluorescente.

La fotólisis de enoxacino, al igual que el ácido nalidíxico, produce la decarboxilación, con la formación de un radical, el cual en el caso de ácido nalidixico da origen a un dímero (22). A partir de los valores de ϕ_C de las quinolonas de la Tabla 1, podemos observar que el ácido nalidíxico (quinolona exenta del anillo piperazínico) presenta una mayor fotoestabilidad que las quinolonas que presentan este anillo. Lo anterior nos lleva a postular que la presencia del anillo piperazínico en quinolonas contribuye a la fotoinestabilidad de éstas. La velocidad de fotodegradación es mayor en aquellas quinolonas con sustituyentes dadores de electrones (anillo piperazínico o metil piperazínico). Sin embargo, ésta disminuye al incorporar en la estructura de las quinolonas un anillo oxacino como sucede en el caso del Ofloxacino. En el caso de esta fluoroquinolona, la menor fotolabilidad que presenta en relación a otras quinolonas fluoradas se debe a la presencia de un anillo oxacino, postulándose un mecanismo para la decarboxilación fotolítica, en el cual el efecto electrón donante del grupo piperazínico competiría con el del anillo oxacino.

Recientemente hemos comprobado que la fotodegradación de quinolonas *in vitro* conduce a la pérdida de la actividad antibiótica (37). La irradiación con luz UVA de ácido nalidíxico, ciprofloxacino y ofloxacino produjo un aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de un 50% frente a las cepas de *E. Coli* y de *S. Aureus*. Para el caso de soluciones en PBS de ofloxacino (10^{-4} N) se necesitó una dosis de radiación de 720 mJ/cm^2 para producir el 50% de fotodecomposición. Los hechos anteriores nos conducen a postular la ruptura de la porción γ-piridona-β-carboxílica (indispensable para la actividad antimicrobiana) con la consecuente

pérdida del grupo carboxílico y formación de un fotoproducto decarboxilado, el cual ha sido demostrado en trabajos anteriores (22, 38).

La fototoxicidad de quinolonas posiblemente se deba a la participación de especies oxigenadas del oxígeno, como oxígeno singlete, anión superóxido y radical hidróxilo. El ácido nalidíxico es capaz de fotooxidar al 2,5-dimetilfurano, reacción parcialmente inhibida por la azida sódica, sugiriéndose la participación de $^1O_2$ en el proceso fototóxico (26). Asimismo, Cárdenas y Fernández (31, 17) reportan un mecanismo fotohemolítico inducido por ácido nalidíxico, en el cual se comprueba la participación de $^1O_2$ y OH^-.

Por otra parte, Dayhaw-Barker y Truscott (36) confirman la participación de $^1O_2$ mediante la detección luminiscente a 1.270 nm. Sin embargo las fluoroquinolonas a diferencia del ácido nalidíxico son sensibilizadores poco eficientes de acuerdo a los bajos rendimientos cuánticos de formación de $^1O_2$ (0,03 a 0,092) y a la baja producción fotosensitizada de anión superóxido (19, 39).

Gibbs et al. (40) al discutir la influencia del grupo sustituyente en C8 de diversas quinolonas, concluyen que las quinolonas que no poseen sustituyentes en C8 presentan una fototoxicidad mínima (ciprofloxacino, enoxacino, norfloxacino y grepafloxacino). En contraste, las quinolonas que poseen sustituyentes en C8 presentan una fototoxicidad aumentada en el orden: Cl > F> OC2CH3> N> C> OCH3.

Los resultados de la Tabla 4 nos demuestran que las quinolonas que poseen un anillo piperazínico en C7 (enoxacino, lomefloxacino, ofloxacino y fleroxacino) presentan un % de fotohemólisis menor que el ácido nalidíxico, quinolona que carece de este anillo. Al contrario de lo que sucede con la fotodegradación de quinolonas, la presencia del anillo piperazínico disminuye la fototoxicidad. Resumiendo, podemos decir que el daño fototóxico de diversas quinolonas está mediado por la especie radicalaria oxígeno singlete ($^1O_2$) (29), es así que las fluoroquinolonas que presentan rendimientos cuánticos de formación de $^1O_2$ bajos, poseen en posición 7 un anillo piperazínico (33), como ciprofloxacino Φ 0,04, lomefloxacino Φ 0,016, norfloxacino Φ 0,017 y ofloxacino Φ 0.007. En cambio, la flumaquina que carece de este anillo piperazínico posee un rendimiento cuántico de formación de $^1O_2$ alto (Φ 0,56) (40).

Como conclusión al trabajo presentado podemos establecer la siguiente especulación. Si estimamos que la radiación solar UVA que penetra a la dermis es aproximadamente de un 20% (41), podemos esperar que una persona expuesta a una radiación solar de 6 mW/cm^2 (máxima irradiancia solar en Valparaíso, Chile, 33º 03'S) durante 10 minutos, sometida a una terapia con ofloxacino, estaría recibiendo una dosis de radiación equivalente a 720 mJ/cm^2, lo que produciría un 50% de fotodescomposición de la droga a nivel plasmático.

De esto se infiere la importancia de conocer la fotolabilidad de las drogas, así como los niveles plasmáticos en las condiciones de irradiancia solar a que está expuesta la población y poder por ende establecer la incidencia de la radiación UV en la estabilidad de los medicamentos y en la génesis de reacciones adversas de fotosensibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

(1) POOLE, K. (2000): Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (10): 2595-2599.

(2) HIRAI, K.; ITO, A.; ABE, Y.; SUZUE, S.; IRIKURA, T.; INOUE, M.; MITSUHASHI S. (1981): Comparative Activities of AM-715 and Pipemidic and Nalidixic Acids Against Experimentally induced Systemic and Urinary Tract Infections. *Antimicrob. Agents Chemother*. 19 (1): 188-9.

(3) RICHTER, S.; PAROLIN, C.; PALUMBO, M.; PALU, G. (2004): Antiviral Properties of Quinolone-based Drugs. *Current Drugs Targets-Infectious Disorses*. 4 (2): 111-116.

(4) DOMAGALA, J. M. (1994): Structure-activity and structure-side-effect relationship for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrobial Chemother.* 33: 685-706.

(5) HOOPER, D. C.; WOLLFSON, J. S. (1985): The fluoroquinolones: Pharmacology, Clinical uses and Toxicities in humans. *Antimicrob. Agents Chemother*. 28: 716-721.

(6) STAHLMANN, R. (1988): Fluoroquinolones-A new Class of Antimicrobial Agent. *Drugs of Today* 24 (7): 529-36.

(7) PATON, J. H., REEVES, D. S. (1988): Fluoroquinolone Antibiotics. *Drugs* 36: 193-228.

(8) HIGGINS, P. G.; FLUIT, A. C.; SCHIMITZ, F. J. (2003): Fluoroquinolones Structure and Target sites. *Curr. Drug Target* 4: 181-90.

(9) DRLICA, K., MALIK, M. (2003): Fluoroquinolnes: Action and Resistance Current. *Topics in Medicinal Chemistry*, 3, 249-282.

(10) LAMBERT, H. P.; O'GRADY, F. W. (1992): Quinolones. In: Antibiotic and chemotherapy Churchill Livingstone. 6 ed. Londres: 245-62.
(11) KIM, O.; OHEMENG, K.; BARRETT, J. (2001): Advances in DNA gyrase inhibitors. *Exp Opin Invest. Drugs* 10: 199-211.
(12) FERGUSON, J., JOHNSON, B. E. (1990): Ciprofloxacin-induced photosensitivity: *in vitro* and *in vivo* studies. *Br. Dermatol.* 123: 9-20.
(13) FERGUSON, J. MC.; EWEN, J.; AL-AJMI, H.; PURKINS, L.; COLMAN, P. J.; WILLAVIZE, S. A. (2000): A comparison on the photosensitizing potential of trovafloxacin with that of othe quinolones in healthy subjects. *J. Antimicrob. Chemother*. 45: 503-509.
(14) TRAYNOR, N. J.; BARRAT, M. D.; LOVELL, W. W.; FERGUSON, J.; GIBBS, N. K. (2000): Comparison of and in vitro cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity. *Toxicol. In Vitro* 14: 275-283.
(15) HIDALGO, M. E.; PESSOA, C.; FERNÁNDEZ, E.; CÁRDENAS, A. M. (1993): Comparative determination of photodegradation kinetics of quinolones. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem* 73: 135-8.
(16) FERNÁNDEZ, E.; PEÑA, W.; VINET, R.; HIDALGO, M. E. (1986): Kinetic of photodegradation of Nalidixic Acid. *An. Quim.* 82: 96-9.
(17) FERNÁNDEZ, E.; CÁRDENAS. A. M.; MARTÍNEZ, G. (1987): Phototoxicity from Nalidixic Acid. *Il Farmaco* 42: 681-690.
(18) MARTÍNEZ, L. J., CHIGNELL, C. F. (1997): Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacine and fleroxacin *Photochem. Photobiol.* 65: 599-602.
(19) MARTÍNEZ, L. J.; SIK, R. H., CHIGNELL, C. F. (1998): Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. *Photochem. Photobiol*. 67: 399-403.
(20) FASANI, E.; BARNERIS, A.; NEGRA, F. F.; MELLA, M.; MONTI, S.; ALBINI, A. (1999): Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxilic acids. *J. Org. Chem*. 64: 5388-5395.
(21) FASANI, E.; MELLA, M.; MONTI, S.; ALBINI, A. (2001): Unexpected photoreactions of some 7-amino-6-.fluoroquinolones in phosphate buffer. *Eur. J. Org. Chem*. 2: 391-397.
(22) FERNÁNDEZ, E.; CÁRDENAS, A. M. (1990): The Mechanism of photohaemolisis by photoproducts of Nalidixic Acid. *Photochem Photobiol.* 4: 329-33.
(23) DETZER, N. and HUBER, B. (1975): Photochimie heterocyclischer enone. I *Tetrahedron.* 31: 1937-41.
(24) VARGAS, F.; RIVAS, C.; MACHADO, R. (1991): Decarboxylation and singlet oxygen producction in the photolysis of nalidixic acid. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol*. 11: 81-85.
(25) REIDD, S. T**.** (1977): Photochemistry. Vol. 8. Ed. J. Wrigth & Sons Ltd., Stonebridge Press. Bristol, pp. 524.
(26) MOORE, D. E.; HEMMENS, V. J.; YIP, H. (1984): Photosensitization by drugs: Nalidixic Acids and Oxolinic Acid. *Photochem. Photobiol*. 39 (1): 57-61.

(27) COSTANZO, L.; DE GUIDI, G.; CONDORELLI, G.; CAMBRIA, A.; FAMA, M. (1989): Molecular Mechanism of drug photosensitization II. Photohemolysis sensitized by Ketoprofen. *Photochem. Photobiol.* 50: 359-65.
(28) BELVEDERE, A.; BOSCÁ, F.; CUQUERELLA, M.; DE GUIDI, G.; MIRANDA, M. (2002): Photoinduced *N*-Demethylation of Rufloxacin and its Methyl Ester Under Aerobic Conditions. *Photochemistry and Photobiology*. 76 (3): 252-258.
(29) CÁRDENAS, A. M.; VARGAS, F.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M. E. (1991): Photoxic Potential of quinolones. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 10: 249-255.
(30) KOCHEVAR, I. E. (1987): Mechanisms of drug photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 6: 891-95.
(31) CÁRDENAS, A. M.; CORTÉS, D.; FERNÁNDEZ, E.; PEÑA, W. (1992): Lipid peroxication and loss of potasium from red blood cells produced by phototoxic quinolone. *Toxicology* 72: 145-51.
(32) CORTÉS, M. P.; CÁRDENAS, A. M.; NAVARRETE, E.; FERNÁNDEZ, E. (1991): Phototoxicity induced by nalidixic and oxolinic acids: decrease in cell survival of chick embryo fibroblast and Hep-2 cells *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 9: 229-234.
(33) MARTÍNEZ, L. J.; SIK, R. and CHIGNELL, C. F. (1996): Singlet oxygen and superoxide yields do not correlate with fluoroquinolone phototoxicity. *Photochem. Photobiol.* 63: 29S.
(34) KHAN, I. E.; FLEISCHACKER, B. S. (1971): Red Blood Cell hemolysis by photosensitizing compound. *J. Invest. Dermatol*. 56: 85-90.
(35) GIVENS, R. S. and LEVI, L. (1979): The photochemistry or organic acid, ester, anhidrides, lactones and amines. In S. Patai (ed.): The Chemistry of Functional Groups, Suppl. B of the Chemistry of Acid Derivatives, Wiley, London, pp. 640.
(36) DAYHAW-BARKER and TRUSCOTT, P. (1988): Direct detection of singlet oxygen sensitized by nalidixic acid: the effect of pH and melanin. *Photochem. Photobiol.* 47: 765-767.
(37) FERNÁNDEZ, E.; SÁNCHEZ, G.; NAVARRETE, E.; DEL ALCÁZAR, F. (2004): Pérdida de la actividad antibacteriana de Quinolonas por efecto de la radiación UVA. *Ars Pharmaceutica* 45 (2): 125-133.
(38) SÁNCHEZ, G. (1997): Estudio fotoquímico y fotobiológico de enoxacino. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Chile.
(39) WAGAI, N. and TAWARA, K. (1991): Quinolone antibacterial agent induced cutaneous phototoxicity: ear swelling reactions in Balb/c mice. *Toxicol. Let* 58: 215-23.
(40) GIBBS, N. (2001): Drug induced skin phototoxicity : lessons from the fluoroquinolones in Sun Protection in man, 337. Ed. Paoulo Giacomoni.
(41) LECHA, M. (1981): The sun and the Skin. *Mundo Científico* 1: 490-501.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 849-859

Artículo Original

Capacidad de dosificación de vehículos semisólidos en cápsulas duras conteniendo Piroxicam 20 mg

NURIA SALAZAR, CARMEN TRIVES y LUIS ALBERTO DEL RÍO
Sección de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo-CEU

RESUMEN

Se propone familiarizar al farmacéutico del Servicio de Farmacia con las formulaciones líquidas y semisólidas contenidas en la forma farmacéutica de cápsulas. Este tipo de formulaciones requieren de un utillaje sencillo.

Para ello se ha elegido como principio activo prototipo a Piroxicam y se han seleccionado vehículos con propiedades fisico-químicas diferentes, esto es, líquidos hidrofílicos y lipofílicos espesados y un vehículo semisólido previamente fundido.

Se han puesto a punto métodos para la determinación de la solubilidad, viscosidad, dosificabilidad de las fórmulas, aspecto y ensayo de disolución. Adicionalmente se ha evaluado la estabilidad a diversas condiciones.

Los mejores resultados han sido los encontrados con el excipiente semisólido de características emulgentes Gelucire® 44/14. Se pueden esperar mejores perfiles *in vivo* al eludirse en el estómago el fenómeno de precipitación y consiguiente, retardo que llevan parejo las otras formulaciones ensayadas. Adicionalmente, la sencillez en su formulación, adecuada fabricación y estabilidad convierten a esta alternativa en interesante para el campo de la Farmacia oficinal.

Palabras claves: Formulación.—Viscosidad.—Cápsulas.—Estabilidad.

SUMMARY

Dosage ability for liquid vehicles filling into hard gelatine capsules containing piroxicam 20 mg

The aim of the article is to familiarize the pharmaceutical compounding phamacist with liquid and semisolids contents in the form of capsules. This type of formulations require simple tools.

For that, Piroxicam has been chosen as a prototype active ingredient also they have been choosen vehicles with different physico-chemical properties, such as hydrophilic and lipophilic liquids that had to be thicker and another semisolid previously melt.

They had been developed methods for the determination of the solubility, viscosity and dosage ability of the formulations. In addition the stability to diverse conditions has been evaluated.

The best results have been found with Gelucire® 44/14, semisolid excipient with emulsifying characteristics. It is possible to find better profiles for the other tried formulations alive when the phenomenon of precipitation and retardation could be avoid in the stomach. Additionally, simplicity in their formulation, suitable manufacture and stability turn to this alternative interesting for it application in the oficinal Pharmacy.

Key words: Formulation.—Viscosity.—Capsules.—Stability.

INTRODUCCIÓN

La vía oral de administración de medicamentos es extremadamente eficaz. Sin embargo el metabolismo presistémico, la limitada absorción a través del epitelio intestinal y la unión al alimento, crean un ambiente hostil para la forma farmacéutica que se traduce en una baja biodisponibilidad lo que implica una falta de proporcionalidad en la dosis y un lento comienzo del efecto terapéutico.

Creemos interesante, para la formulación magistral en los Servicios de Farmacia, una alternativa galénica en forma de cápsulas con contenidos líquidos (1) y semisólidos en vez de los clásicos pulverulentos. Se puede destacar como ventaja que al encontrarse disperso el principio activo en la formulación se obtiene un mejor perfil biofarmacéutico (2).

En el presente trabajo se establecen las especificaciones de diseño del producto, seleccionan los excipientes más adecuados, definen una serie de formulaciones y se fijan las variables críticas de los procesos por medio de estudios de idoneidad de la cápsula, caracterización del principio activo y los vehículos, procesado, dosificado, disolución y estabilidad.

Para la investigación se ha elegido como principio activo a Piroxicam, antiinflamatorio no esteroideo indicado fundamentalmente

en el tratamiento de la artritis reumatoide y del dolor (3). Su elección se debe a su escasa solubilidad y la baja velocidad de disolución en el medio gástrico (4), lo que le convierte en un candidato idóneo para nuestros objetivos. Se le considera un prototipo representativo de principios activos a bajas dosis, dado que un cambio de fármaco no debe incidir en su modo de dispersión en los diferentes vehículos y, por consiguiente, en su capacidad de dosificación en la forma farmacéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las materias primas que se han utilizado en la fabricación de las distintas fórmulas han sido como principio activo, Piroxicam RFE/Ph Eur. (Quimivita, S. A., Barcelona), como vehículos (5) líquidos: Miristato de isopropilo RFE/Ph Eur. (Guinama, S. A., Valencia), Dietilenglicol monoetil éter RFE/Ph Eur. (Gattefosse, S. A., Francia) y Macrogol 400 RFE/Ph Eur. (Merck, S. A., Alemania). Estos han requerido la viscosización con Aerosil® 200 RFE/Ph Eur. (Dióxido de silicio. Degussa, S. A., Alemania). Como vehículo sólido a temperatura ambiente se ha utilizado Gelucire® 44/14 RFE/Ph Eur. (Macrogolglicéridos de lauroilo. Gattefosse, S. A., Francia). Las cápsulas utilizadas han sido Licaps® transparentes de tipo 1 (Capsugel, S. A., Francia).

Preformulación. Para determinar la solubilidad del principio activo en los distintos vehículos, se pesan alrededor de 50 mg de Piroxicam con exactitud y se van añadiendo con agitación constante en agitador magnético volúmenes conocidos del vehículo líquido a temperatura ambiente hasta conseguir la completa disolución.

Para determinar la viscosidad (6) de las fórmulas líquidas a temperatura ambiente se utilizó un viscosímetro rotatorio modelo Viscotest VT5® (Haake GmbH, Alemania). La viscosidad en reposo se determina tras haber mantenido las muestras sin agitación durante 24 horas a una temperatura comprendida entre 20-22º C. La viscosidad en condición de agitación se determina tras disponer las muestras durante 30 minutos en un agitador magnético a una velocidad de 1.100 rpm. a la temperatura anteriormente citada.

La repetibilidad de la dosificación, como expresión de la idoneidad de la fórmula y el proceso tecnológico, se determina pesando 450 µL de la mezcla (Vehículo/Aerosil® 200 en distintas proporciones) tomados con micropipeta. Esta operación se realiza diez veces con cada mezcla y se calcula la media de los pesos obtenidos, y la desviación estándar relativa (RSD).

Fabricación. Las formulaciones con vehículos líquidos a temperatura ambiente se obtienen dispersando el principio activo en cada uno de los vehículos y viscosizando la mezcla con la proporción adecuada de Aerosil® 200.

Para la fabricación de la fórmula cuyo vehículo es sólido a temperatura ambiente, se funde (7) Gelucire® 44/14 y a continuación se dispersa en él el principio activo.

Se dosifican 100 cápsulas con cada fórmula. Para el llenado de las cápsulas se colocan las cápsulas vacías en un capsulador semiautomático Capsunorm® y se dosifican con una pipeta Multipette® plus. En la dosificación de las fórmulas se utiliza un Eppendorf Combitip® de 10 mL de capacidad, dosificando 400 µL en cada cápsula, se asegura así la dosificación de 20 mg de Piroxicam por unidad.

Control. La uniformidad de masa se realiza según el método descrito en la Real Farmacopea Española (8) 2002, con 20 cápsulas por fórmula.

Se realiza un examen visual para comprobar que las cápsulas dosificadas no son telescópicas, no tienen restos de fórmula en el exterior, están secas, limpias y no presentan fenómeno de fugas.

El ensayo de disolución (9) realizado a las fórmulas es el recogido para cápsulas de Piroxicam en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP (10). Para ello se utiliza el aparato 1 o de cestillos a una velocidad de giro de 50 r.p.m., se introducen las cápsulas (12 unidades) en 900 mL de medio de disolución (fluido gástrico simulado sin pepsina), y se determina el porcentaje de dosis disuelta a los 45 minutos mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 334 nm. La tolerancia que establece la USP es, «*No menos del 75% de la dosis debe estar disuelto en 45 minutos*».

Las condiciones de estabilidad a las que se someten las cápsulas estudiadas son las recomendadas por International Conference on Harmonisation (11), 25º C/60% H.R. y 40º C/75% H.R., además de 25º C/30% H.R. y 40º C/30% H.R., como condiciones desfavorables, evaluándose al mes de almacenamiento. Junto con las muestras se introducen cápsulas vacías como control para discriminar el comportamiento de las fórmulas en las distintas condiciones.

RESULTADOS

La solubilidad de Piroxicam en los distintos vehículos se recoge en la Tabla 1. Piroxicam es muy poco soluble en Miristato de isopropilo, y soluble en pequeñas cantidades de Dietilenglicol monoetil éter y Macrogol 400, siendo en todos los casos insuficiente para disolver la dosis (20 mg) en el volumen disponible en las cápsulas tipo 1 (0,5 mL).

Las fórmulas líquidas a temperatura ambiente se ajustaron con un agente viscosizante, Aerosil® 200. Para ello, se determinó la viscosidad con el husillo y a la velocidad de deformación adecuados, tanto en reposo como tras agitación de las diversas mezclas con proporciones de Aerosil® 200 comprendidas entre el 2% y el 10% (m/m) del peso total de la mezcla, excepto con Dietilenglicol monoetil éter para el cual el rango de trabajo fue del 2% al 12% (m/m). Se buscaba la proporción de Aerosil® 200 que confiriera una viscosidad elevada al vehículo en reposo para así evitar su fuga de las cápsulas. Por otro lado, debía tener una viscosidad mínima adecuada tras agitación para permitir la correcta dosificación de la mezcla, según los resultados recogidos en la Tabla 2.

TABLA 1. *Partes de disolvente (m/m) necesarias para disolver una parte de Piroxicam*

Miristato de isopropilo	Dietilenglicol monoetil éter	Macrogol 400	Gelucire® 44/14
1077,22	35,11	50,76	—*

* Dato no disponible por ser sólido a temperatura ambiente.

TABLA 2. *Viscosidad (mPas) de las mezclas de Aerosil® 200 en distintas proporciones con los vehículos líquidos utilizados medida en condición de reposo 24 horas y tras agitación 30 min.*

	Miristato de isopropilo		Dietilenglicol monoetil éter		Macrogol 400	
% Aerosil® 200	**Reposo**	**Agitación**	**Reposo**	**Agitación**	**Reposo**	**Agitación**
2%	48	40	38	38	263	185
4%	84	62	54	47	320	286
6%	175	117	75	65	560	450
8%	588	156	95	80	690	480
10%	1270	810	125	88	750	480
12%*	—	—	134	122	—	—

* Solo se realiza con Dietlinglicol monoetil éter por su baja capacidad de respuesta.

Adicionalmente se realiza la prueba de repetibilidad de la pesada para comprobar que las viscosidades anteriormente obtenidas con las diversas proporciones de Aerosil® 200 permiten la dosificación de las mezclas, expresada como variabilidad de las pesadas, según los datos recogidos en la Figura 1.

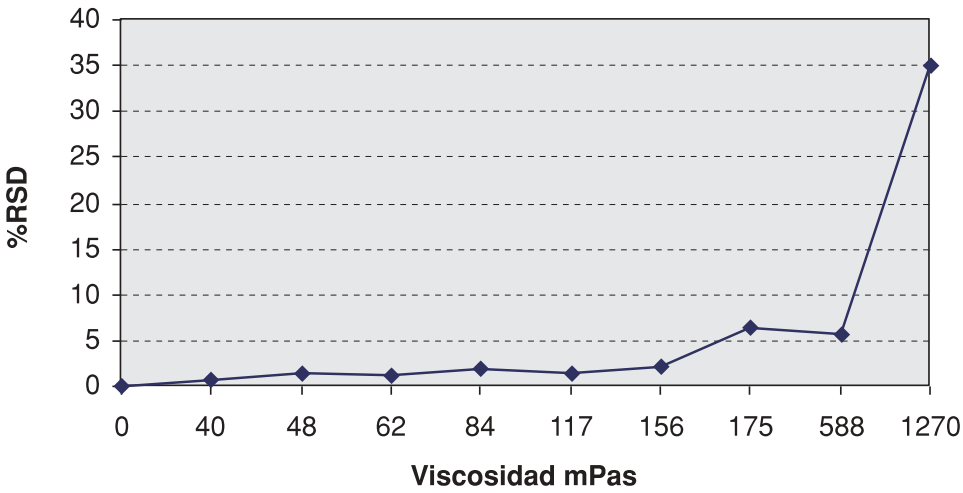


FIGURA 1. *Viscosidad frente a repetibilidad de la dosificación expresada como RSD.*

La fórmula a base de Miristato de isopropilo (MTO), se viscosiza con Aerosil® 200 en proporciones que van desde el 2 al 10% (m/m). En todos los casos, al disminuir la viscosidad obtenida para las mezclas tras su agitación, se favorece el proceso de dosificación aún con las mezclas de mayor contenido en Aerosil® 200. En función de las desviaciones obtenidas en las fórmulas tras agitación es la mezcla que contiene Aerosil® 200 al 6% la candidata, ya que su valor de RSD es menor del 2%, error máximo que admitimos en la dosificación.

Para la formulación que incorpora Dietilenglicol monoetil éter (DTM), la proporción de Aerosil® 200 fijada es la del 12% y en la fórmula a base de Macrogol 400 (MAC), se establece el 8%.

Las fórmulas finales, con la proporción de Aerosil® 200 anteriormente definida, se encuentran en la Tabla 3.

TABLA 3. *Fórmulas elaboradas*

	MTO		DTM		MAC		GEL	
Materias primas	**mg**	**%**	**mg**	**%**	**mg**	**%**	**mg**	**%**
Piroxicam	20	5,7	20	5	20	4,0	20	5
Aerosil® 200	18,68	5,3	40,71	10,2	31,85	7,0	—	—
Miristato de isopropilo	311,32	89	—	—	—	—	—	—
Dietilenglicol monoetil etér	—	—	339,29	84,8	—	—	—	—
Macrogol 400	—	—	—	—	398,15	89	—	—
Gelucire® 44/14	—	—	—	—	—	—	380	95
TOTAL	350	100	400	100	450	100	400	100

En lo que respecta a la calidad de las formulaciones fabricadas, el aspecto inicial es conforme.

En cuanto a la disolución, debe destacarse que el comportamiento de las cápsulas formuladas con Miristato de isopropilo no es adecuado, ya que presentan un perfil de disolución muy bajo, la media del porcentaje de dosis disuelta a t_{45} es del 4,9%, siendo la especificación de la USP, «*No menos del 75% de la dosis debe estar disuelta a los 45 minutos*». Esto se explica al apreciarse que la mezcla medicamen-

tosa, una vez desprendida y disuelta la gelatina de la cápsula, se encuentra prácticamente íntegra al finalizar el ensayo. La lipofilia del vehículo ha impedido la humectación y disolución del contenido. Este hecho nos parece preocupante, dado que la elección de este excipiente se ha justificado por su similitud lipofílica con vaselina, vehículo empleado en el caso de las cápsulas de gelatina blandas (12).

Los resultados del estudio de disolución de las cápsulas formuladas con Dietilenglicol monoetil éter y Macrogol 400 son superiores en comparación con los de la formulación con Miristato de isopropilo, debido a la mayor hidrofilia que presentan. Sin embargo, que Piroxicam se encuentre en parte disuelto en la forma farmacéutica no garantiza su disolución en el medio ácido, ya que posiblemente precipita al entrar en contacto con el medio.

Los resultados obtenidos con la fórmula que incorpora Gelucire® 44/14 (GEL), cumplen las especificaciones del ensayo de disolución. Este hecho se puede explicar por la capacidad emulsionante del vehículo que facilita la micelización y disolución del fármaco.

El perfil medio (realizado con doce cápsulas por fórmula) de disolución de las distintas formulaciones se encuentra recogido en la Figura 2.

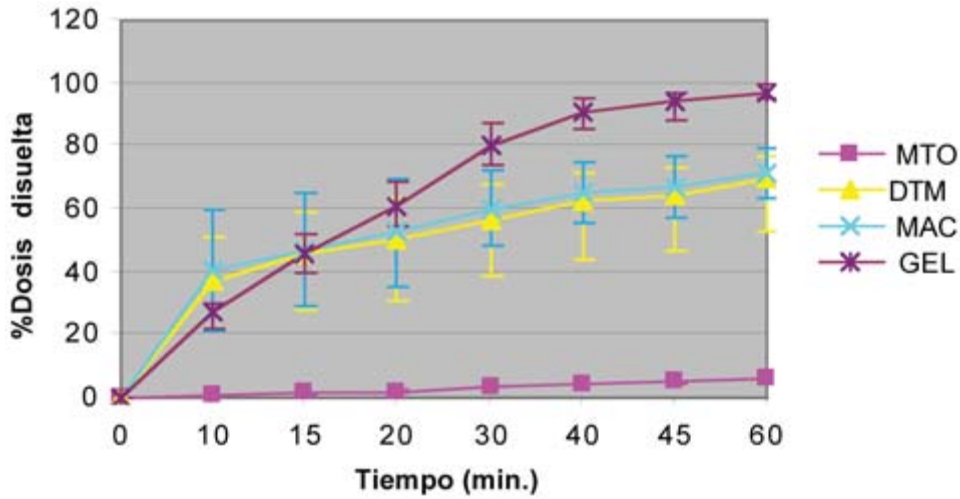


FIGURA 2. *Representación de la media y rango del % de dosis disuelta frente al tiempo de las fórmulas fabricadas.*

Respecto a la estabilidad podemos afirmar que a excepción de las cápsulas formuladas con Gelucire® 44/14, el resto de las fórmulas no cumplen el aspecto tras su almacenamiento en las distintas condiciones, ya que se aprecia en las cápsulas exudado e incluso separación de fases.

En la Tabla 4 se recogen los resultados de las distintas formulaciones.

TABLA 4. *Variaciones de peso (expresado en %) y aspecto de las cápsulas formuladas en las diferentes condiciones de almacenamiento estudiadas*

Condición/mes	MTO	DTM	MAC	GEL	Patrón
25º C/60% HR	–0,8 Fugas	–6,4 Fugas Separación fases	+6,0 Fugas Separación fases	+0,6	+0,6
25º C/30% HR	–1,0 Fugas	7,5 Fugas Separación fases	–2,4 Fugas Separación fases	0,5	–0,9
40º C/75% HR	–6,1 Fugas	— Deterioro	+20,7 Fugas Separación fases	+2,4 Fundido	+2,9
40º C/30% HR	–3,2 Fugas	–10,6 Fugas Separación fases	–2,7 Fugas Separación fases	+0,1 Fundido	–2,9

En la formulación que incorpora Gelucire® 44/14 como vehículo, el comportamiento es satisfactorio al ser similar al de las cápsulas patrón. Como era de esperar, en las cápsulas sometidas a 40º C/75% HR, condición de envejecimiento acelerado, el contenido se encuentra fundido.

DISCUSIÓN

Entre las formulaciones fabricadas, aquélla que se encuentra en suspensión con Miristato de isopropilo y Aerosil® 200 ha presentado unos insuficientes resultados en cuanto a su disolución farmacéutica debido a la alta lipofilia y viscosidad de la pasta así formada y a su estabilidad física.

Cuando Piroxicam se encuentra parcialmente disuelto, como es en el caso de las fórmulas cuya base es Macrogol 400 y Dietilenglicol monoetil éter viscosizadas con Aerosil® 200, se ha mejorado su disolución farmacéutica aunque haya resultado insuficiente conforme a las especificaciones de la USP. Este hecho es explicable por cuanto a la inicial dispersión molecular del activo en el vehículo le sigue su precipitación en el fluido acuoso fuertemente acidificado del medio de disolución. Su estabilidad física resulta también, insuficiente.

En cuanto a la fórmula a base de Gelucire® 44/14, tanto su desarrollo como su fabricación ha sido diferente por tratarse de un excipiente sólido a temperatura ambiente. Esto supone una ventaja doble, por un lado, a la hora de desarrollar la fórmula, ya que no necesita ser viscosizada y, por otra parte, a la hora de la fabricación de la mezcla medicamentosa, ya que son menos excipientes los que se incorporan. Dicha formulación presenta los mejores resultados en su disolución cumpliendo con las especificaciones de la USP. Este hecho se debe a una supuesta micelización de Piroxicam en el medio de disolución, gracias al citado excipiente de características tensioactivas. Adicionalmente, la sencillez en su formulación, adecuada fabricación y estabilidad convierten a esta alternativa en interesante para el campo de la formulación magistral en los Servicios de Farmacia.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto Becado por la Universidad San Pablo-CEU. Ref. 16/02.

BIBLIOGRAFÍA

(1) BOWTLE, W. J. (1998): Liquid Filling of Hard Gelatine Capsules: A New Technology for Alternative Formulations. *Pharm. Techn. Eur.* 10: 84-90.

(2) SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M. y DEKKER, T. (2000): Dissolution properties of piroxicam powders and capsules as a function of particle size and the agglomeration of powders. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26: 1067-76.

(3) Ficha técnica Piroxicam 20 mg cápsulas (2003): http://www.onfarma.com.

(4) MIHALIC, M.; HOFMAN, H.; KUFTINEC, J.; KRILE, B.; VEZNA, C.; KAJFEZ, F. *et al.* (1986): Analytical profiles of drug substances. *American Pharmaceutical Association*. 15: 509-531.

(5) PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS 2000 CD-ROM (2000): Washington, DC. American Pharmaceutical Association.

(6) LOMBARDIN, P.; LEVERD, E.; GOUTAY, E.; BOUGARET, J.; GROSSIORD, J. L. y SEILLER M. (2002): Thixotropic bases for the filling of hard capsules : in vitro release. *S. T. P. Pharm Sci*. 12: 139-42.

(7) ROWLEY, G.; HAWLEY, A. R.; DOBSON, C. L. y CHATHAM, S. (1998): Rheology and filling characteristics of particulate dispersions in polymer melt formulations for liquid fill hard gelatin capsules. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24: 605-11.

(8) Real Farmacopea Española. II edición (2002): Madrid. Ministerio de Sanidad y Consumo, 215.

(9) FDA Dissolution testing of inmediate release solid oral dosage forms (1997): US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Washington.

(10) The United States Pharmacopeia 27 & The National Formulary 22. 27 & 22 ed. (2004): Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1487.

(11) International Conference on Harmonization. Q1A Stability Testing Of New Drug Substances And Products (2001): August http://www.fda.gov/cder/guidance/4282fnl.htm.

(12) BB.DD. de Medicamentos. Consejo General de Colegios de Farmacéuticos (2003): http://www.portalfarma.com.

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 949-989

Necrológica

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez

El Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez nació el día 21 de diciembre de 1923 en Madrid. Tomó posesión como Académico de Número el día 15 de diciembre de 1991 de la Medalla número 42. Falleció el día 19 de noviembre de 2004. La Sesión Necrológica se celebró el día 28 de abril de 2005, participando los Excmos. Señores Académicos Don Federico López Mateos, Don Gaspar González González y Don Manuel Domínguez Carmona. Fue presidida por el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Segundo Jiménez: el químico, el maestro, el amigo

FEDERICO LÓPEZ MATEOS
Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Excmas. Señoras y Excmos. Señores Académicos.

Querida Ana María de Garnica y Oncins, viuda de Don Segundo Jiménez Gómez.

Queridos hijos, nietos, hermanos, familia toda de Don Segundo.

Queridos amigos,

Señora y Señores.

Aunque recordar sea volver a vivir y el acto que hoy nos reúne traiga de nuevo a nuestras mentes la angustia y la aflicción de ánimo que produce el hecho irreversible de haber perdido la posibilidad de compartir inquietudes, transmitir sentimientos y vivir ideales con la confianza y el afecto que nos ofrecía la persona que nos dejó camino de la eternidad, alabo la sensibilidad de los miembros de esta Real Academia que tienen por norma honrar a sus compañeros cuando pasan a la inmortalidad con un acto de recuerdo, que es poner su atención en la actividad profesional y humana de aquél para, una vez más, agradecer su esfuerzo y la generosidad de su entrega al habernos permitido compartir sus conocimientos.

Entiendo que, también en esta ocasión, se está haciendo Academia, porque nos reunimos para mostrar el camino recorrido por los que nos precedieron y mirar a la antorcha encendida del Saber que han llevado en sus manos para seguir con ella dando luz al desarrollo de las teorías que interpretan los fenómenos y respuesta a las

necesidades e inquietudes de una sociedad preocupada por su supervivencia.

Al llegar este día, conmocionado por los actos en recuerdo de los también académicos de esta Casa, los doctores: Sanz Pedrero, González Trigo, Villanúa Fungairiño y Espinós Pérez y el más reciente fallecimiento de Don Ángel Santos Ruiz, agradezco a la Junta de Gobierno de la Real Academia Nacional de Farmacia su invitación, primero, y su decisión, después, para que intervenga en esta sesión en memoria del académico Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez.

Siento sobre mí la deseada pero enorme responsabilidad que supone poner ante ustedes objetivamente la vida de un hombre, los valores de un profesional de la Química, la formación integral de un intelectual y, subjetivamente mis vivencias y sentimientos en torno a sus actividades, siempre impregnadas por el amor a su familia, el ideal cristiano de la solidaridad y respeto para y con sus semejantes, del que somos sus amigos y compañeros los primeros recipiendarios, y el servicio a los intereses de nuestra España por sus trabajos para el aprovechamiento de sus recursos y para el prestigio de su presencia en el mundo.

Cuando se contemplan juntos estos aspectos y se sitúan en el entorno socioeconómico en que se desarrollaron los hechos, se observa que el esfuerzo de entonces adquiere una nueva dimensión, por supuesto humanamente más valiosa, porque las dificultades del momento estimularon la respuesta en la que con las potencias del alma: memoria, inteligencia y voluntad se superaron las deficiencias materiales.

Reconstruir aquellas actuaciones es emocionante porque, o se han vivido junto al protagonista o se tienen que deducir directamente de documentos o de la comunicación verbal con quienes le conocieron.

Con los amigos se habla sobre el quehacer de cada día, se comenta y hasta se discute sobre las vicisitudes del momento y hasta se piensa en voz alta sobre proyectos de futuro, pero en pocas ocasiones es el pasado motivo de demasiada atención. El pasado es historia que deben escribir otros a los que se pide rigor en la descripción de los hechos buscando, en todo caso, el motivo que generó aquellas situaciones.

Yo quiero en esta tarde, ya lo estoy haciendo, traerles mi historia de la vida de Don Segundo para que quede constancia de su trabajo, de los sentimientos que me inspiró, de su hombría de bien, de la figura que yo me he forjado en 43 años de amistad compartida y sus primeros 38 años que he podido conocer revolviendo sus papeles y confesando a quienes estuvieron a su lado en ese período de España, desde 1923 a 1960.

Segundo Jiménez es el arquetipo del químico universitario español de la segunda mitad del siglo XX que realizó los estudios de su carrera al acabar la Guerra Civil. Buscó y halló su realización personal en su profesión a la que dedicó toda su atención y esfuerzo para vivir económicamente con dignidad e intelectualmente con honor, que es cualidad moral que conlleva el riguroso, exacto y puntual cumplimiento de los deberes, tras de los cuales se alcanza la buena reputación que sigue la virtud y al mérito por el trabajo que transciende a la familia.

Nació en Madrid el 21 de diciembre de 1923, hijo de Don Mariano y Doña María de los Reyes, ambos maestros nacionales, castellanos recios, austeros que inculcaron a él y a sus hermanos José y María Amalia el valor del trabajo y la perseverancia como garantía para su formación.

Siguió la enseñanza primaria en el Colegio de los Salesianos de Atocha, muy cerca de su casa en el Paseo de las Delicias. A los diez años, como era normal, inició el bachillerato que acababa con aquella prueba que al ser superada era garantía de formación cultural: el «examen de estado».

El esfuerzo que debió realizar en aquellos años de bachillerato, lo realizaron también los mayores de esta Casa, es digno de ser exaltado. Entre los años 34 y 40 el ambiente social no era propicio para el estudio, pero él continuó, mientras pudo, como alumno libre en los Salesianos y luego en Cáceres y Salamanca hasta donde había llegado la familia Jiménez Gómez tras un complicado recorrido. Pero el final, de vuelta a Madrid, fue brillante y esperanzador porque en los dos últimos cursos recaló en el instituto Cervantes —que junto al de San Isidro, al del Cardenal Cisneros, y, poco después, al de Ramiro de Maeztu, eran los únicos institutos masculinos de Madrid— y allí se encontró como catedrático de Física y Química a Don An-

tonio Mingarro Satué que junto a Don Vicente Aleixandre Ferrandis fueron los grandes de la Física y la Química del bachillerato por su saber, sus libros y por su personalidad profesional. ¡Cuántas vocaciones despertaron aquellos estupendos catedráticos de instituto!

Descubrió la Química de la mano de Mingarro y le debió parecer un sueño cuando doce años más tarde se encontró trabajando con él en Piritas Españolas, la empresa que se ha llevado, al menos, la mitad de su quehacer profesional.

Los estudios de la licenciatura en Ciencias, sección Químicas, los realizó en la Universidad Central, a caballo entre San Bernardo y la Ciudad Universitaria. Era una carrera monolítica estructurada sobre once disciplinas, aunque algunas tenían asignaturas en dos cursos. Es evidente cuál debía ser el alcance de la Química española en aquel momento: mucha Química Inorgánica, bastante Química Analítica, poca Química Orgánica y de Química Industrial, reflejo de la industria química española, prácticamente nada. Estaba casi todo por hacer.

Todavía, antes de iniciar el desarrollo profesional de su carrera tuvo que dedicar casi un año a realizar el servicio militar en la Milicia Universitaria. Visto a la distancia de 60 años, se recuerda como algo que formaba parte de la vida de los universitarios aunque te machacaba dos veranos y luego, al acabar la carrera tenías que estar seis meses, ya de alférez, en un cuartel. A cambio, en esos meses, recibías el sueldo de oficial, tentador para muchos licenciados que no habían visto juntas como propias 2.000 pesetas hasta entonces.

Aquel joven licenciado no atendió a la tentación, de modo que se encontró al iniciarse el curso 1948-49 deseando ser un químico útil, con muchas ganas de trabajar pero con unas perspectivas poco claras en aquellos momentos pobres para la Ciencia, la Técnica y la Economía española.

Yo creo que tuvo la intuición de que la actividad académica podía ser el camino para progresar siguiendo su profesión, sabiendo siempre que las horas de estudio y reflexión eran sus herramientas. Como tarea central decidió iniciar los estudios de doctorado bajo la dirección del catedrático de Química Analítica de la Universidad Central, Don Fernando Burriel Martí, y entró en contacto con el Instituto de

Edafología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Paralelamente colaboraba como ayudante de clases prácticas de las enseñanzas de Química en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos; una triple entrada hacia un objetivo común: el magisterio universitario y la orientación hacia la agricultura, camino que no abandonaría nunca, aunque fuera compartido.

Pero la iniciación eficaz de su vida activa se produjo a finales de 1949, cuando ganó el concurso para incorporarse como becario al Instituto Nacional de Técnica Aeronáutica.

Fue destinado al laboratorio de Lubricantes por elección directa de su Ingeniero Jefe, que era otra persona conocida y querida en esta Casa, Don Ángel Vián Ortuño.

Es bonito recordar cómo fue el encuentro entre estas dos excelentes personas. Lo narró el propio Segundo Jiménez en la sesión que se celebró en esta Real Academia en memoria de nuestro maestro común:

> «Se había convocado un concurso para cubrir tres plazas de becario en el INTA, dotadas con la módica cantidad de 500 pesetas mensuales. Éramos quince aspirantes y había que superar cuatro ejercicios, dos de ellos prácticos; lo que hoy no deja de sorprender si se comparan con los dos que en la actualidad se precisan para acceder a Catedrático de Universidad.
>
> Al comenzar el tercer ejercicio, primero de los prácticos, apareció en el laboratorio Don Ángel Vián, a quien yo no conocía físicamente. Cambiaba impresiones con los concursantes y al llegar a mí se interesó por el examen; le dije estar satisfecho, pues ya tenía identificado uno de los dos componentes del problema —alcohol etílico— y creía tener bien orientada la del otro, aunque se me presentaban algunas dudas sobre si era aceite de ricino o ácido ricinoléico.
>
> ¿Para qué tiene usted el olfato? Me preguntó. Y en aquel momento mi mente se colmó de pedantería, o quizá mejor de inmadurez, hasta el punto de que le repliqué que conocía muchos procedimientos de análisis químico rigurosamente científicos, pero el olfato no figuraba entre ellos.

Pues el olfato —me contestó a su vez— no será un procedimiento rigurosamente científico, pero es muy útil. Aún insistí en mi tozudez y le contesté una nueva tontería: ¿Y si no tengo olfato? Pues si carece de olfato —me dijo, terminando nuestro diálogo— tiene usted un handicap enorme para ser un buen químico. Y salió del laboratorio cerrando la puerta con cierto impulso.

A la mañana siguiente, mientras realizaba el último ejercicio práctico, un empleado me hizo saber que el Doctor Vián quería verme. Al terminar el examen entré en su laboratorio y me dijo: ¿qué le pasó a usted ayer? Le contesté lo que pude y como pude; eso sí, con una buena dosis de humildad con la que intentaba hacer olvidar la pedantería del día anterior. Después añadió: No está usted peor que los demás. En el supuesto de que apruebe, ¿querría trabajar conmigo? En aquel momento por mi mente paso de todo: sorpresa, admiración, gratitud, reconocimiento tardío por el consejo que no había oído. No sé, mil cosas más».

Hasta aquí Segundo Jiménez.

Oigan ahora cuál fue la impresión que le causó a Don Ángel su llegada al laboratorio:

«La incorporación de Jiménez al INTA creo que fue un revulsivo en su formación, pues me parece que vio allí, en sus tareas junto a mí, otra dimensión de la Química, la que esta ciencia tiene cuando fuera de la pura especulación se proyecta en la indagación y aprovechamiento del para qué de las cosas. Lo que se llama tecnología. Ante un problema de reformado de gasolinas para su adaptación aeronáutica, fue decisiva su aplicación y buen juicio para lograr un gel de sílice, como catalizador, con poros dimensionados a la medida de las moléculas que habían de sufrir la transformación».

En paralelo con el trabajo en el INTA desarrolló la experimentación y elaboró su tesis doctoral en los laboratorios de Química Analítica de la Facultad y el 15 de enero de 1952 defendió brillantemente su tesis doctoral titulada: «El empleo de bases diluyentes en análisis espectral. Aplicación a la determinación de elementos traza».

El tribunal estuvo constituido por los pilares de la Química de la Universidad Central, presidido por Don Manuel Lora Tamayo al que acompañaban Don Miguel Catalán Sañudo, Don Antonio Rius Miró, Don Fernando Burriel Martí y Don Octavio Rafael Foz Gazulla.

El Doctor Jiménez debió trabajar mucho y bien y de forma consistente para que Don Ángel Vián se sintiera satisfecho y seguro de su porvenir científico, por eso cuando en ese año 1952 el Instituto Nacional de Industria le pidió que acometiera desde su raíz el problema de mejorar el beneficio de los yacimientos de pirita de Huelva, no dudó en proponerle para que se hiciera cargo de la Sección de Análisis de la División de Investigación Industrial de Piritas Españolas.

Una de las consecuencias de aquel fructífero año 1952 en el que ganó el prestigio del doctorado y tuvo su continuación con la garantía profesional y económica por el trabajo en el INI, fue el que el 2 de mayo de 1953 contrajese matrimonio con doña Ana María y que, poco a poco, fueran llegando Ana María, José Ramón, María Reyes y Fernando.

El trabajo que desarrolló en Piritas fue abrumador, cualquiera que sea el ángulo desde el que sea observado y juzgado. En primer lugar al enfrentarse con el mineral pirítico en cuya composición el 90% es azufre y hierro, pero en el que el 10% restante está constituido, prácticamente, por todos los elementos del sistema periódico cuando sólo se conocían 90. En segundo lugar, porque con las técnicas analíticas de aquel tiempo, al final, los resultados procedían de volumetrías y gravimetrías. En tercer lugar, porque el personal auxiliar contratado para el laboratorio no tenía formación química. En cuarto lugar, porque el espacio físico del laboratorio, cedido provisionalmente por la Empresa Nacional Calvo Sotelo en el recinto de su Centro de Investigación de la calle Embajadores, 183 era inadecuado, inhóspito y peligroso. Con la actual Ley de Riesgos Laborales en la mano no nos hubieran permitido ni acercarnos a aquel lugar. Sin embargo, el reto que le habían presentado, la oportunidad de trabajar con futuro en la química y, porque no, el convencimiento de que con los objetivos propuestos España saldría adelante y los españoles mejorarían sus recursos hacia que aquella cincuentena de personas que constituían Piritas trabajara con entusiasmo, sin

escrúpulos y con alta dosis de esperanza. Allí, «aprendiendo y enseñando a la vez, consiguió no sólo dominar primero y mejorar después los métodos analíticos de tan complejo mineral, sino merecer también que su laboratorio fuera nombrado "fiel contraste" de los datos analíticos en los que se basaban grandes transacciones de minerales y sus productos, en las que una divergencia en el análisis suponía sumas de dinero muy considerables».

En este punto yo quiero recordar al otro químico que trabajando codo a codo con él consiguieron la fiabilidad de los resultados de aquel laboratorio de análisis. Me refiero, aunque él tampoco pueda oírme y sean pocos de los que estamos aquí los que le conocieron, a Don José Manuel Quincoces Morales. Digo que fue un químico analítico excepcional: practicante implacable del método experimental, riguroso en su quehacer, leal a la ciencia y a sus instituciones. Su genio indomable, su disciplina espartana y la seguridad de sus conocimientos y determinaciones nunca pudieron ser rebatidos. El dúo complementario y difícil Jiménez-Quincoces definió procedimientos y métodos analíticos y formó un equipo de analistas que normalizó la caracterización de las piritas. Transcribo la carta que el consejero delegado de la empresa envió el 22 de noviembre de 1960 a la dirección de la División de Investigación Industrial de Puntas Españolas:

> «Al tener la satisfacción de transmitirles la adjunta carta del Instituto de Racionalización del Trabajo, nos es muy grato expresarles, especialmente al Servicio de Análisis de la División, nuestra felicitación por la buena acogida y general asentimiento con que han sido recibidas las primeras normas UNE publicadas por el Instituto de Racionalización del Trabajo propuestas por nosotros para la unificación de definiciones y procedimientos analíticos de piritas, minerales afines y residuos de su tostación.
>
> Les rogamos hagan llegar esta felicitación al personal que más ha contribuido y contribuye a la elaboración de estas normas en reconocimiento de su eficaz trabajo».

Más tarde, en 1970, el Doctor Jiménez era nombrado vocal de la Comisión Técnica de Trabajo, número 30. Industrias Químicas del Instituto Nacional de Racionalización del Trabajo.

Cuando el laboratorio de análisis estaba normalizado y trabajando en régimen estacionario, rebasando la esfera de sus obligaciones, supo inventarse otras nuevas y se sumó al esfuerzo de los que estaban obligados a la creación técnica para crear procedimientos, desarrollar y adaptar procesos.

Su atención investigadora se dirigió hacia:

- La recuperación industrial de metales por cambio iónico y extracción de disoluciones.
- El diseño y estudio de procesos selectivos de lixiviación con fines hidrometalúrgicos de metales no férreos.
- La formación y estabilidad térmica de arseniatos y sales básicas.

Aparte publicaciones científicas y técnicas en revistas españolas y extranjeras, fue autor de una veintena de patentes de invención referentes al aprovechamiento de las piritas arsenicales.

Por su actividad investigadora en el INI fue condecorado con la Orden de Alfonso X El Sabio.

Aquí entro yo en juego para seguir una de las líneas de investigación abiertas por él. En marzo de 1961 el profesor Vián me había propuesto como trabajo experimental de la tesina de licenciatura el estudio del comportamiento de los arseniatos de cinc de la mano de Don Segundo; aquello acabó con buenas perspectivas y pronto me ofreció realizar la tesis doctoral como becario de Piritas. El tema era ambicioso, se trataba de seguir la evolución del arsénico contenido en las piritas, desde el mineral, pasando por las cenizas de tostación en lecho fluidizado y la extracción ácida de los metales no férreos para dejar limpia una matriz de óxido de hierro que pudiera ser alimentada al homo alto para obtener hierro.

Don Ángel me dejó en manos del Doctor Jiménez, que fue el director ejecutivo de aquella tesis. Yo era un almacén de conocimientos desordenados e inconscientes, con los ojos muy abiertos pero sorprendido y sin saber cómo aprovechar mis recursos. Comprendí pronto que necesitaba un maestro que me orientase y aprovechase mis potenciales energías químicas. Doy fe de que lo encontré y hoy, otra vez, se lo agradezco.

Ya les he dicho algo sobre los métodos analíticos de los años cincuenta, pero quiero decirles un poco más. Determinar el arsénico contenido en el mineral pirítico era una obra de arte: se molturaban aquellas piedras, se homogeneizaba y se preparaba una muestra sólida representativa que había que atacar con los reactivos más agresivos, después de muchas operaciones de precipitación, lavados, procesos de oxidación-reducción y toda la parafernalia química, después de una semana de trabajo se llegaba al final. Una de aquellas etapas consistía en la precipitación del arsénico como sulfuro mediante una corriente de sulfhídrico que se generaba en un aparato ingenioso diseñado por Kipp. Otro día les explicaré su funcionamiento.

El caso es que yo hacía aquellos análisis y para no interferir en la marcha del laboratorio, y para hacer méritos, me montaba el generador de sulfhídrico y, lo que era más grave, al agotarse el sulfuro que reaccionaba con ácido clorhídrico había que vaciar el aparato de Kipp. En una de aquellas faenas, que se realizaban en un patio, yo respiré más sulfhídrico residual de la cuenta, me mareé, caí al suelo..., en fin, un numerito. Al volver en mí, me encontré con la cara de Don Segundo que ahora quiero recordar que estaba más asustado que yo. Me atendió, me ayudó a recuperarme y me llevó a la casa de mis padres en que vivía. Hasta que volví a hacer vida normal fue a verme cada día. Pocas veces lo volvimos a recordar, pero aquel día sentí que el Doctor Jiménez, además de maestro, empezaba a ser un amigo entrañable.

A pesar de mis indagaciones no he podido estimar cuántas horas dormía diariamente Segundo Jiménez en los años sesenta. En Piritas Españolas estaba de 8 de la mañana a 3 de la tarde. En la Escuela de Agrónomos, donde nunca dejó el profesorado desde 1949, fue profesor auxiliar, adjunto interino, encargado de curso y en 1964 ganó por oposición la cátedra de Química de la Escuela Técnica de Grado Medio y en 1970, también por oposición, la cátedra de Química de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.

El Excmo. Señor Don Gaspar González nos va a ilustrar con detalle sobre sus inquietudes y quehacer agrario y su trabajo académico en esta Escuela hasta su jubilación.

En el curso 1963-64 siguió el curso y obtuvo el diploma de ICADE para dirección de empresas. Un paso más en su formación y

superación continua y en su evolución natural desde la química hasta la estrategia de producción en la industria química.

Por si fuera poco, en aquellos años se puso en marcha el Instituto de Medicina y Seguridad en el Trabajo que, dirigido por el excelente profesor Don Manuel Bermejillo, preparó las primeras promociones de Médicos de Empresas. Don Ángel Vián fue llamado a colaborar en aquel primer claustro de profesores por la trascendencia de los contaminantes químicos en los ambientes laborales y detrás fuimos el Doctor Jiménez y yo mismo para impartir clases prácticas e iniciar esa doctrina que hoy es objetivo del quehacer en las instalaciones de fabricación: Producción, Seguridad y Protección del Medio Ambiente.

Y, además, dirigía eficazmente mi tesis hacia su final. Don Ángel que escribía como los ángeles, aunque tenía un genio endemoniado, apretaba las clavijas a Don Segundo, que llegó a escribir tan bien como él, y yo, que preparaba los originales recibía, merecidamente, improperios en cascada de todos los colores cuando leían y me corregían los borradores de la tesis que salió muy bien.

En este conjunto de recuerdos que nos acercan a Segundo Jiménez, ahora por su gramática y literatura, no quiero silenciar la eficaz colaboración de Isabel Álvarez Barral, que siempre ha puesto la guinda de la calidad, de la exactitud de los términos, de la pulcritud exquisita en nuestros escritos.

Al poco tiempo de defender mi tesis doctoral fui destinado a la sección de Instalaciones Industriales que dirigía el hoy profesor Ángel Romero González, catedrático emérito de Química Industrial de la Universidad de Alcalá de Henares, compañero inseparable y amigo entrañable del Profesor Jiménez desde que en octubre de 1952 se embarcaran juntos en la aventura del INI. Ellos dos fueron los más estrechos colaboradores de Vián, responsables de la infraestructura científica y técnica de la investigación aplicada y el desarrollo en planta piloto de los procesos. Ángel Romero recuerda con emoción y nostalgia al amigo que participó de sus inquietudes profesionales y humanas en 52 años de vida: «tenía una capacidad de trabajo envidiable, para él no existía el cansancio, su aguda perspicacia analítica ofrecía siempre un abanico de resultados desde el que humildemente te aconsejaba siempre el mejor». También discutían,

por supuesto, yo lo he visto, sobre todo cuando jugaban al mus o al dominó.

En el año 1974 se produce una fuerte convulsión en Piritas Españolas, Don Ángel Vián, como ha dejado escrito Segundo Jiménez, «cansado y aburrido, agotada su paciencia, abandonó la causa piritera». No es hoy el día de hablar de esa causa pero basta decir, desde la autoridad y responsabilidad que me confiere ser catedrático de Química Industrial, que allí no hubo fracaso, cambiaron las circunstancias que habían estimulado el tema: la autarquía española no tenía sentido y el azufre aparecía por toneladas desde diferentes orígenes, el más importante por la desulfuración de las fracciones de petróleo.

¿No sustituyó Alemania la Carboquímica por la Petroquímica? Esa es la grandeza de la Tecnología, dar respuesta en cada momento a las demandas de la sociedad de la forma más económica con los recursos disponibles y los descubrimientos científicos.

Don Segundo Jiménez accedió a la dirección de la División de Investigación Industrial de Piritas Españolas, que tomó la denominación de Auxini Investigación Aplicada, en la que los trabajos relacionados con la Tecnología del Medio Ambiente fueron prioritarios. Desde aquel cargo, en los diez años que duró esa responsabilidad, supo encauzar el trabajo de su equipo de investigadores para que aplicasen sus conocimientos científicos y sus herramientas tecnológicas al estudio de problemas que empezaban a acuciar a la Humanidad, pero a los que se tienen que dar soluciones por sectores, más concretamente, desde el punto en que se produce la agresión, por la doble vía de eliminar los vertidos actuando sobre el procedimiento de producción o proyectando sistemas de depuración para cada vertido.

Esta manera y amplia línea de investigación ha llenado el resto de su vida, activa hasta su fallecimiento.

Esta Academia conoce mucho de la preocupación del Doctor Jiménez por estar en la vanguardia del conocimiento sobre este asunto, que nos va a recordar el Excmo. Señor Don Manuel Domínguez Carmona, y su claridad para transmitirlo desde este foco del Saber en el que ingresó como Académico Correspondiente en 1974 y leyó su primer discurso como Académico de Número el 5 de diciembre de 1991; en su *laudatio* queda escrito:

> «Don Segundo es uno de esos discípulos excepcionales que, de vez en cuando, nos nacen a quienes ejercemos el magisterio; de esos que están por encima de nuestros méritos y que forman algo así como las perlas de la corona con que suelen obsequiarnos los años de ejercicio procurando dejar nuestra huella a través de la claridad de los que nos sucedan. Aquí tenéis un caso así».

La Academia ha sido un estímulo para mantener viva su vocación y su plataforma intelectual en la que impartió conferencias, cursos de doctorado y desarrolló iniciativas y desde la que se proyectó a otros focos para seguir dictando lecciones, participando activamente en cursos de verano y organizando, por ejemplo, los Congresos Internacionales de la Asociación Nacional de Químicos de España de los años 90-92-94 y 96.

Es la hora de ir acabando, no porque no haya más cosas que decir, unas no las digo porque otros van a incidir sobre ellas, y otras pertenecen a esa comunicación personal en la que se confunden los consejos del maestro, las inquietudes del compañero de profesión y la confianza del amigo.

Nosotros, mi mujer y yo, nos quedamos con muchos recuerdos pero, sobre todo, quizá por ser el último, con el de aquella reunión del 29 de octubre en la que lleno de vida, en una conversación a ocho bandas, larga, variopinta, aguda, chispeante, optimista, nos estábamos despidiendo, sin saberlo, de un hombre que hizo de su vida un culto a la profesión con la creencia firme de que aquel era el camino para proyectarse en la Sociedad y alcanzar la Gloria.

Consiguió su objetivo con honor y nos deja un legado ejemplar de trabajo y amistad. Con estos aplausos va nuestro agradecimiento.

Segundo Jiménez Gómez: Químico agrario comprometido

GASPAR GONZÁLEZ GONZÁLEZ
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. Preámbulo

Una vez más esta Real Academia me concede el luctuoso honor de contribuir a una sesión necrológica en homenaje a uno de sus miembros más distinguidos, hoy el que fue insigne académico y tesorero hasta su fallecimiento, profesor Segundo Jiménez Gómez. Entrañable amigo Segundo que, cuando escribo estas líneas, salvando las distancias, me hace recordar la bellísima elegía de San Agustín a la muerte del amigo añorado, en la que puede leerse: «*Bien dijo uno de su amigo que era la mitad de su alma*» (1).

Recuerdo mi primer contacto con él; fue a mediados del año 1952, cuando esperaba ser recibido por Don José María Albareda para hablar de su futura trayectoria profesional y académica que quería proyectar sobre la agricultura a través de la Edafología. Hubo, después, un largo interregno en el que no tuvimos relaciones personales, aunque sabía de su actividad docente e investigadora en las áreas de la agroquímica y del medioambiente. Al comienzo de la década de los noventa nos pusimos en contacto a través de nuestro común amigo el académico Ángel Vián Ortuño, con motivo de la organización de un curso de verano de la UCM que tuve el honor de dirigir en Almería el año 1992, bajo el título: *La agricultura española en el año 2000,* curso en el que el profesor Jiménez Gómez pronunció una magistral conferencia sobre *Los abonos orgánicos y la materia orgánica edáfica* y participó en una Mesa Redonda sobre Agroquímica y Medioambiente. A partir de entonces fue creciendo nuestra amistad y se afianzó la colaboración en otros eventos relacionados

con los mismos temas, hasta el punto de ser uno de los académicos que con más entusiasmo avalaron mi ingreso en esta Real Academia, para el que había sido propuesto por los Académicos De Jordana Vicente, Vián Ortuño y Sanz Pérez.

Estos son los títulos que, además de entrañables relaciones personales, justifican mi intervención en este acto; y debo añadir que por razones de trayectoria profesional y académica, tendría mucho que decir, más de lo que permite el espacio disponible, sobre las aportaciones del profesor Segundo Jiménez a la *docencia, la investigación y la divulgación agrarias;* aparte de otros aspectos de su polifacética personalidad, que son tratados con mayor autoridad y conocimiento por los académicos Domínguez Carmona y López Mateos.

2. Formación, docencia agraria e investigación agroquímica

El Doctor Segundo Jiménez fue un químico comprometido, digo sí comprometido con la agricultura, con el medio ambiente y con la sanidad; compromiso que desbordaba el campo de lo meramente instrumental para moverse en el ámbito de los valores, de la ética; porque una cuestión ética es la necesidad del dominio del uso de la técnica y de las posibilidades de la ciencia en beneficio de todos. Y como tal la analizaba, como luego veremos.

Después de su licenciatura y doctorado en Ciencias Químicas, con las máximas calificaciones en la UCM, y publicar diez trabajos de investigación sobre análisis químico en colaboración con los profesores Burriel Martí y Ángel Vián, complementa sus estudios en 1963 graduándose en el prestigioso ICADE —a donde acudía a cursos nocturnos para no desatender su actividad laboral— que le dio la impronta económica que necesitaba, Segundo Jiménez, como antes José María Albareda, y sus discípulos: Antonio Carpena, Ernesto Vieitez, Francisco González, etc., químicos como él o farmacéuticos, decidió poner sus conocimientos científicos, básicos, al servicio de las técnicas agrarias y medioambientales. Para ello contó con la buena acogida del referido profesor Albareda, quien le orientó para obtener una beca por oposición del Instituto de Edafología en 1952, nombrándole poco después, Colaborador Honorario. Seguidamente, estimulado por los pro-

fesores Don Ángel Vián Ortuño y, sobre todo, por Don Juan Santamaría, Catedrático de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, como reconocimiento a su saber, fue invitado a incorporarse a la docencia agraria. Así pues, fue Catedrático de Química Orgánica, primero (1952-56), después Profesor Adjunto de Ampliación de Física y Química y Profesor Encargado de Curso de Química en la Escuela Técnica de Peritos Agrícolas y de Ingeniería Técnica Agrícola y de Química e Introducción a la Físico-Química de la E. T. Superior de Ingenieros Agrónomos, incorporación que culmina con la obtención de la cátedra de Química y la dirección del Departamento de Química y Análisis agrícola, de esta última, hasta su jubilación en 1988, vertiendo en todos estos cargos docentes su entusiasmo por la ciencia y la investigación. De hecho fue el primer catedrático universitario, no agrónomo, en dichas escuelas técnicas.

Siguiendo la estela de grandes figuras de la Química como Lavoisier y Liebig, a quienes dedicó unas eruditas páginas en los bicentenarios celebrados en esta Real Academia (2, 3), creía firmemente en el valor de la Química y de la Biología, como bases para desarrollar la agricultura práctica, las técnicas agrarias y para conservar o mejorar el medioambiente y con ello la sanidad. Y con el estudio y la investigación de materias fundamentales de la Química: la Química analítica y el Análisis químico, como nos dice López Mateos, obtiene las herramientas y la experiencia que le permitirán el brillante desarrollo de su actividad docente e investigadora en las materias citadas: agronomía, medio ambiente y sanidad.

Con esta base propone, en principio, cuatro áreas de investigación en la Universidad Politécnica de Madrid: a) desarrollo de tecnologías para obtener fertilizantes de liberación lenta mediante el recubrimiento con colofonia y fosfato tricálcico; b) la descontaminación metálica del agua por extracción con colofonia como reactivo natural; c) la desmetalización de lodos de depuradoras para eliminar su toxicidad y facilitar su reciclado a la agricultura, con el diseño de proceso y planta experimental en continuo; y d) tratamiento de residuos agrícolas con fines descontaminantes, con recuperación energética y obtención simultánea de compost para la conservación de suelos sin riesgos sanitarios tóxicos. Dentro de estas áreas realizó concretos trabajos de investigación, siguiendo dos líneas acordes con su formación que van desde la Química analítica: *Análisis, separación y estabilidad de pro-*

ductos analgésicos fitofarmacéuticos y agrícolas (4), hasta la Tecnología química: *Recuperación de aceites y de azúcares de productos naturales no convencionales* (5, 6). Asimismo su formación investigadora en estas áreas se reflejó en nueve, de las trece tesis doctorales que dirigió en las Universidades Politécnica, Autónoma y Complutense de Madrid. Hay que añadir que sus primeras intervenciones en cursos y seminarios sobre agroenergética, empleo de plásticos y de lodos en la agricultura en la Universidad Politécnica de Madrid y en el Instituto de España desde 1980 a 1988, así como los trabajos de investigación sobre suelos (7-10), la utilización de plásticos para proteger los cultivos (11-13) y, en especial, sobre fertilizantes (14-17), demuestran el recto camino que siguió para cumplir su compromiso con la agricultura española, tanto desde el punto de vista teórico como práctico.

3. El medioambiente y la sanidad

Al Doctor Segundo Jiménez, como científico de su tiempo, le preocupaba el continuo deterioro de nuestro entorno vital como consecuencia de tres fenómenos sociales simultáneos: el crecimiento demográfico, el desarrollo y afinamiento de las necesidades humanas y el desaforado consumo de recursos naturales que conllevan, con la amenazadora secuela del aumento desorbitado de residuos especialmente de naturaleza orgánica. En su compromiso con el medioambiente, pronto vio que estos *residuos,* la *contaminación* que provocan y el *reciclado* eran tres aspectos íntimamente ligados de los que depende la *sostenibilidad* de los ecosistemas naturales y agrarios y la *sanidad* de la población. Sobre estos aspectos centró el contenido de muchos de sus trabajos; así: veintitrés libros y artículos doctrinales y de divulgación; treinta ponencias y comunicaciones en congresos, y las ochenta conferencias que dio en los catorce cursos y seminarios organizados por muy diversas instituciones: Servicio de Protección de la Naturaleza, SEPRONA; Colegio Libre de Eméritos; Cursos de Verano de la UCM en El Escorial (1990, *Residuos de origen vital*) y Almería (1993, *La materia edáfica como factor que limitante en la agricultura*), dirigidos respectivamente por Ángel Vián Ortuño y el que les habla, en la Universidad de Verano de Lanzarote, etc., y de modo reiterado en esta Real Academia Nacional de Farmacia. En esta última se puede citar como ejemplo la conferencia: *Efectos de la contaminación*

sobre los terrenos, que pronunció en 1988 coincidiendo con el final del Año Europeo del Medioambiente en el ciclo con el título general: *Efectos de la contaminación*, cuyo contenido amplió y completó con su magistral Discurso de Inauguración del Curso Académico en 2004 (18). De hecho, los Cursos de Doctorado en los que intervino, patrocinados por el Instituto de España y esta Corporación, se referían por lo común a aspectos medioambientales y sanitarios. Precisamente poco antes de su ingreso urgente en el sanatorio había proyectado en colaboración con el Académico Doctor Doadrio Villarejo, coordinar un curso monográfico sobre *Contaminación - Residuos - Salud*, e intervenir con diez lecciones en otro de doctorado sobre *Aspectos sanitarios y ambientales en la promoción de la salud* con la profesora Francés Causapé y yo mismo.

4. La divulgación agraria y la educación medioambiental

Consciente de la importancia inmediata de la divulgación en el sector agrario, dio a la luz con esta concreta finalidad más de veinte trabajos, de entre los que cabe destacar los referidos a los fertilizantes de liberación lenta (19). Su experiencia y conocimientos en este campo le llevó a publicar con otros seis brillantes colaboradores (Doctores C. Cadahía, M. C. Cartagena, J. A. Díez, M.ª Fernández, A. Pueyo y A. Vallejo) un manual de lectura obligada para quienes quieran penetrar en el conocimiento de los beneficiosos efectos tanto medioambientales —evitando la eutrofización del agua, la intoxicación y erosión del suelo, y la contaminación de la atmósfera—, como económicos —aminorando o suprimiendo las pérdidas por volatilización, fijación irreversible o lixiviación de bioelementos, que reporta el uso de fertilizantes de este tipo—. Dentro de este afán divulgador hay que situar las citadas ochenta conferencias que dictó en cursos y con otros motivos en muy diversos momentos y lugares, así como las entradas «Medio Ambiente», «Biomasas» y «Residuos de origen vital» de la Enciclopedia Durban y otras numerosas publicaciones sobre contaminación y aprovechamiento de estos últimos (20-24).

Esta su preocupación por la contaminación, por sus repercusiones sobre el ecosistema y, finalmente, sobre la salud, le hacía insistir en la necesidad de una educación acorde, educación que comenzaba

por la de sus allegados más íntimos. Su hija Ana, Catedrática de Geografía en el Instituto Beatriz Galindo, fiel seguidora de las enseñanzas de su padre, me decía en una conmovedora carta, a raíz de su fallecimiento, que dicha preocupación por el medioambiente *le llevaba a recordar continuamente en familia que el uso de los llamados productos de higiene doméstica acababan contaminando las aguas*. Otrosí, al ocuparse de los Antecedentes y Objetivos del Sexto Programa de Acción Ambiental de la U.E. en su contribución al Foro de Reflexión y Difusión del Conocimiento impulsado por la Sección IV de esta Real Academia, afirmaba rotundamente que «*La educación medioambiental es el punto de partida para la convivencia en una sociedad democrática*» (25).

5. El reciclado de los residuos

Cuando se repasan los referidos trabajos de investigación, doctrinales y de divulgación, pronto se ve que el profesor Segundo Jiménez no solamente se ocupaba de los efectos contaminantes de los residuos sino que, como agroquímico, aplicaba sus profundos conocimientos básicos al reciclado o reconversión de los mismos, haciendo hincapié en los beneficiosos efectos, tanto sanitarios como económicos que éste reporta, y a su relación con la sostenibilidad. De este modo enlazaba con el sentir de sus reconocidos maestros de siglos anteriores. *Personajes como Liebig* —decía en la «Conmemoración de su Bicentenario» (3)— *al preocuparse por conocer los mecanismos de reciclado, prestaron un valioso servicio a las comunidades que iban a sucederle. Nuestra sociedad actual es deudora de aquellos investigadores, al igual que las futuras lo serán de las presentes*. Y deudora es la sociedad española de Segundo Jiménez no sólo por las aportaciones que hizo a los tratamientos de los residuos de «origen vital» —como específicamente denominaba a los orgánicos generados durante el uso de los vegetales y animales por estos últimos y, sobre todo, por el hombre—, sino también por su contribución a la mejora de nuestra tecnología agraria, en general. Y aquí debo añadir que con harta frecuencia se le requirió como presidente, vocal o ponente en congresos, simposios, mesas redondas, foros, comités y asambleas relacionados con la agricultura y el medioambiente. Mientras que por sus aportaciones a la docencia, la investigación y la divulgación agrarias y medioambien-

tal recibió el Primer Premio de Investigación Técnica sobre Medio Ambiente del Excmo. Ayuntamiento de Madrid y la Encomienda de la Orden Civil del Mérito Agrícola.

Pero volviendo al tema del reciclaje de los residuos hay que señalar que tal importancia daba a esta tecnología que a ella dedicó el memorable Discurso de Ingreso en esta Real Academia a finales de 1991 bajo el sugerente título: *Los residuos de origen vital: ¿Problema o recurso?* En él describe las cinco vías que se abren a su uso: a) obtención de energía y productos químicos; b) devolución a la producción agraria (fertilizantes); c) alimentación ganadera; d) sustrato productivo, y e) alimentación humana; analizando magistralmente las ventajas e inconvenientes de los procesos térmicos, químicos, bioquímicos y biológicos que se pueden aplicar en cada caso. Pero insiste especialmente en la vía segunda: los tratamientos bioquímicos mediante compostaje para devolver al suelo los residuos en forma de compost o estiércol artificial con la finalidad de incrementar o mantener, al menos, la materia orgánica edáfica y con ello la fertilidad y el sostenimiento de la agricultura; no olvidando que muchos de estos residuos de origen vital pueden entrar de nuevo en la cadena alimentaría humana. Como colofón responde a la pregunta que se plantea en los siguientes términos: «*Parece pues, claro, que los residuos de origen vital han de considerarse ya como un* ***recurso****. Su eliminación por razones higiénico-sanitarias es obligada, pero no lo es menos su aprovechamiento para disminuir la demanda de recursos del medio y la presión ecológica de este sobre nuestras estructuras vitales y de convivencia*» (20).

La doctrina del Doctor Jiménez Gómez no puede ser más oportuna. Constituye un hecho incuestionable el continuo empobrecimiento en materia orgánica a que están sometidas las tierras de cultivo; y ante la escasez de alimentos que padece la humanidad, es bueno recordar que anualmente se pueden reciclar para la alimentación, mediante los procedimientos que cita, muchos de los millones de toneladas que se despilfarran, sobre todo si se mejoran previamente los sistemas de recolección en origen, algunos de los eslabones de las cadenas de distribución, y se atiende a su separación en los usos domésticos.

La última aportación documental del profesor Segundo Jiménez al quehacer magistral de esta Real Academia fue el discurso que leyó en

la sesión inaugural del curso 2003-2004 (18), dedicado a la memoria del profesor Ángel Vián. Este discurso fue un espléndido resumen de todas aquellas cuestiones objeto de su preocupación docente e investigadora a lo largo de su vida académica. Después de una breve introducción y síntesis en las que justifica la elección del tema y expone su doctrina basada en la propia experiencia y en las enseñanzas de sus ilustres predecesores, especialmente de José M.ª Albareda Herrera, sobre los usos, composición, estructura y funcionalidad del suelo agrícola, hace referencia a los fenómenos que contribuyen a su destrucción como los procesos naturales de erosión, y la «colaboración indolente del hombre», acción antropogénica que ha empezado a percibirse con toda su intensidad en el primer tercio del siglo pasado dando lugar a la denominación de antropoceno, o era antropológica al último período geológico del planeta. De estos procesos antropogénicos separa los fenómenos contaminantes que tienen su origen en sectores económicos ajenos a los suelos de cultivo, de las malas prácticas agrarias u otras actividades directamente unidas a la producción agrícola, dentro de las cuales incluye la búsqueda de nuevos suelos de cultivo, la conservación de la materia orgánica y el conjunto de secuelas incorporadas por la agricultura intensiva caracterizada por un alto consumo de energía de apoyo como consecuencia de la mecanización, el consumo de fertilizantes, fitosanitarios y herbicidas, el incremento de los regadíos y la selección genética que exigen críticamente las nuevas formas de agricultura sostenible o de conservación y de precisión. La contaminación del suelo a que suelen dar lugar fue objeto de su análisis, así como los sistemas físicos, químicos y biológicos (biorremediación y fitorremediación) para su recuperación.

6. El compromiso social y ético. La ética del medioambiente

El Doctor Segundo Jiménez, agroquímico comprometido con el medio ambiente y el desarrollo social, no era uno de esos «bárbaros especialistas» que, creo recordar, fustigaba Unamuno. Manifestaba su preocupación por el bienestar de la humanidad; y así las disponibilidades y la calidad del agua, la producción de alimentos y el hambre fueron objeto de varias conferencias y trabajos (27-29). Tenía, además, una faceta humanística que le llevaba a preocuparse por los problemas de orden ético que resultan del estar del hombre

en la naturaleza; problemas exacerbados a partir de los sesenta cuando se toma plena conciencia de los peligros que entrañan para la humanidad la ciencia y la técnica en su afán por ponerlas, sin restricciones, a su servicio. En uno de sus escritos afirmaba que «*La ética ambiental y educación subsiguiente tienen que estar presididas por la idea de que lo que la humanidad tiene, todo lo que posee de la Tierra procede y a la Tierra ha de volver, pero de nosotros depende que su retorno se produzca en condiciones de reversibilidad y susceptible de ser reutilizado por las generaciones futuras*» (26).

La ética de su medioambientalismo rechazaba tanto el antropocentrismo exagerado aún vigente, que puede llevar al abuso de la naturaleza, como la ecología profunda, surgida de las ideas de algunos filósofos escandinavos y australianos, con una visión holística que prima a la comunidad biótica frente al individuo —el todo (las comunidades bióticas, por ejemplo), no sólo tiene un valor superior al de cualquiera de las partes que lo constituyen (los individuos), sino que supera al de la suma de sus partes—, con su correlato: el biocentrismo igualitario, teleológico, de Paul Taylor que postula que todas las formas de vida, incluida la humana, tienen el mismo valor intrínseco y el mismo derecho a que se respete su propio bien y que, en resumen, margina al hombre. El doctor Jiménez Gómez, en el Epílogo de su conferencia, «Ética y educación ambiental: recursos imprescindibles» advierte del peligro de caer en estas posturas cuando señala que «*Una cosa es promover la conservación de los valores bioculturales y otra introducirse en el peligroso campo de la ecología profunda en el que se abandona el humanismo para abrazar un biocentrismo igualitario. Eso sería como si el hombre renunciara al uso de la razón: es decir, como si renunciara a ser hombre, lo cual de hecho sería peor que su propia desaparición como especie*» (26). Nuestro añorado académico conjugaba el humanismo con su cristianismo, en la medida en que ambos basan su doctrina o actividad vital en una concepción integradora de los valores humanos, aunque en el último se da la suprema importancia a la Verdad y a la Caridad que coinciden en Cristo.

7. Segundo Jiménez: el hombre

Mi íntima relación con Segundo Jiménez, resultado de nuestra convivencia en multitud de eventos académicos y sociales, me per-

miten citar con conocimiento de causa otra faceta de su poliédrica humanidad. A sus profundos saberes científicos y tecnológicos, unía una gran cultura, con un extenso conocimiento del idioma, que manejaba con fluidez y tino. Era un ávido lector y tenía la mente abierta al análisis de todas las doctrinas. Cito como paradigma que el último libro que tenía sobre su mesa de trabajo fuese, precisamente, el del sobresaliente y bien conocido científico, agnóstico, Peter Atkins: «El dedo de Galileo» (31). Los que lo hayan leído saben bien lo que esto significa en aras de lo que acabo de afirmar.

Segundo Jiménez era fiel y generoso con sus amigos, agradecido con sus maestros, siempre apegado a sus discípulos; generosidad, agradecimiento y apego que manifestaba en cualquier ocasión propicia. De lo primero mi mujer Ana María y yo, con muchos otros colegas y amigos aquí presentes, somos testigos de cómo con su esposa, Ana María de Garnica, no desperdiciaba ocasión para reunirnos y agasajarnos en su hogar o fuera de él. De su agradecimiento y devoción a sus maestros queda constancia escrita en las encomiásticas menciones que hace a los que fueron sus más inmediatos mentores, sobre todo a los que de modo más inmediato influyeron en su vida profesional y académica, como los profesores Burriel Martí, Vián Ortuño, Carpena Artés y Santamaría (32, 33). Del apego a sus numerosos discípulos, algunos ya catedráticos y maestros que siguen su estela como los académicos Ernesto Castañeda, M.ª del Carmen Cartagena y M.ª Dolores Climent, es una prueba el orgullo con que nos los presentaba y la indefectible asistencia con que premiaban sus cursos y conferencias.

Segundo Jiménez Gómez, desde que el año 1974 ingresa como Correspondiente en esta Real Academia, se vinculó en cuerpo y alma a la misma «*consciente* —decía— *de que el rango y dignidad de aquella designación no podía tener parangón con el de Académico de Número*» (32), honor que alcanzó en 1991 a propuesta de los fallecidos académicos profesores Vián Ortuño, Carpena Artés y Sanz Pedrero, ocupando el sillón 43 de nueva creación.

En fin, sería traicionarlo no dar cuenta en este acto de dos facetas trascendentales de la personalidad de Segundo Jiménez Gómez: su amor a España y la dimensión cristiana de su vida. De la primera daba pruebas fehacientes como militante activo del partido político

que mejor lo manifiesta; de la segunda, su pertenencia a la Comunidad Cristiana de Matrimonios de los Jesuitas. De hecho, ahora que los intelectuales suelen hacer alarde de su ateísmo o agnosticismo, el profesor Segundo Jiménez, como tantos otros científicos de valía, no dudaba en afirmar que era creyente, católico fervoroso. Lo vi con vida, por última vez, en la reunión de la referida Comunidad, el viernes 5, un día antes de su ingreso urgente en el Sanatorio de Nuestra Señora del Rosario donde cristianamente falleció poco después, el 19 de noviembre del 2004; en verdad, aciago año, aciago para esta Corporación que lamenta la pérdida durante el mismo de otros cinco ilustres miembros, y aciago para España por motivos que todos conocemos y lamentamos.

Termino dando cuenta a su esposa Ana María de Garnica, a sus hijos Ana, Reyes, Fernando y José Ramón, y a sus nietos y hermanos, del sentimiento de vacío que el fallecimiento de Segundo deja en esta Real Academia, en todos nosotros y en particular en el ser, en el cotidiano vivir, del matrimonio que formamos mi mujer Ana María Doncel y yo. Consuela pensar que, como tesorero de su diario quehacer, es seguro que se habrá presentado ante el Creador con un balance claramente positivo. Y esto, como él quería y manifestó en sus últimos momentos, debe ser motivo de alegría. Tengo la certeza de que, «desde el seno del Señor, y con los ojos del espíritu, asiste complacido a este acto». Descanse en paz.

He dicho.

REFERENCIAS

(1) SAN AGUSTÍN (1963): *Las Confesiones*. Obras de San Agustín, Texto bilingüe, 4.ª edición. Biblioteca de Autores Cristianos (B.A.C.), Madrid. Tomo 2.º, p. 162.

(2) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1994): «Lavoisier: Antecedentes del actual desarrollo químico». Conmemoración del II Centenario de la muerte de Lavoisier, *Anal. Real Acad. Farm.* 65: 529-539.

(3) ID. (2003): «La química agrícola de Liebig: Una forma de integración de conocimientos». *Anal. Real Acad. Nal. Farm*., 69: 597-612.

(4) JIMÉNEZ, J., MINGOTT, S. (1975): «Análisis de productos fitosanitarios dimetilfosfóricos». *Anal. Real. Acad. Farm*. 41: 309-322.

(5) JIMÉNEZ, S.; BURÓN, I., GARCÍA, R. (1977): «Cinética de extracción del aceite de bellota por percolación con hexano». *Agroq. Tecnol. Alim*. 17: 363-371.

(6) GARCÍA, R.; BURÓN, I., JIMÉNEZ, S. (1997): «Factores de influencia e índices de deterioro de la conservación de la bellota y su harina». *Agroq. Tecnol. Alim*. 17: 429-500.

(7) BURRIEL-MARTÍ, F.; JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1953): «Análisis espectroquímico de Ni, Co, Zn y Mo en suelos y plantas». *Anal. Edafol. Fisiol. Veg*. Tomo 12, n.º 1, pp. 1-11.

(8) BURRIEL-MARTÍ, F.; JIMÉNEZ GÓMEZ, S., ÁLVAREZ HERRERO, C. (1954): «Sobre el análisis espectrográfico en la determinación simultánea de los cationes de cambio en suelos». *I Anal. Edafol. Fisiol. Veg*. T. 13, n.º 5, pp. 1-2, y 1955, *II Anal. Edaf. Fisiol. Veg.* T. 14, n.º 4, pp. 1-15.

(9) BURRIEL-MARTÍ, F., JIMÉNEZ, S. (1995): «Revisión de métodos colorimétricos para la determinación de azufre en diferentes formas en minerales, suelos y plantas». *Anal. Edafol. Fisiol. Veg.* T. 14, n.º 2, pp. 1-12.

(10) BURRIEL-MARTÍ, F.; JIMÉNEZ, S., RODRÍGUEZ DE LA PEÑA, M.ª (1958): «Determinación de Boro en suelos y plantas. I Método colorimétrico de análisis». *Anal. Edafol. Fisiol. Veg*. T. 17, n.º 6, pp. 1-22, y *Anal. R. Soc. Esp. Física y Química,* T. 54, n.º 1, pp. 35-42.

(11) CASTAÑEDA, E.; CONTRERAS, A. A., JIMÉNEZ, S. (1982): «Estudio comparativo de las propiedades de diversos materiales utilizados como cubierta en cultivos protegidos». *Rev. Plásticos Modernos*, n.º 308, pp. 185-190.

(12) CASTAÑEDA, E.; CONTRERAS, A. A., JIMÉNEZ, S. (1982): «Valor agronómico de diferentes materiales plásticos empleados como cubierta en cultivos protegidos. I. Efectos sobre la producción». *Rev. Plásticos Modernos*, n.º 310, p. 417. «II. Efectos sobre la precocidad y calidad de la cosecha». *Ídem,* n.º 313, p. 563, y «III. Eficacia de los distintos tratamientos en interacción con la nutrición del cultivo». *Ídem,* n.º 318, p. 597.

(13) CASTAÑEDA, E., JIMÉNEZ, S. (1983): «Viabilidad de los invernaderos de plástico en diferentes regiones españolas». *Rev. Plásticos Modernos,* n.º 320, p. 197.

(14) JIMÉNEZ, S.; CARTAGENA, M.ª C., MATEO, J. M.ª (1985): «Estudio de los diagramas de solubilidad como base para la preparación de fertilizantes de acción controlada con NH_4 NO_3 I. Sistema NH_4NO_3/Mg $(PO_2H_2)_2$ $6H_2O/H_2O$». *Anal. Edafol. Agrobiol*. 43: 1623-1625, y «II. Sistema $NH_4NO_3/MgSO_4.7H_2$ O/H_2O». *Ídem,* 1633-1649.

(15) JIMÉNEZ, S.; CARTAGENA, M.ª C.; VALLEJO, G A., CASTAÑEDA, E. (1987): «Study of the behaviour of a NH_4NO_3 rosin-coated fertilizer I. Kinetics of solubility in dynamic sistem». *Agrochimica,* 31: 12-17. *Ídem,* 1988: «II. Kinetics of solubility in dynamic system for mixed coated products: rosin-tricalcic phosphate». *Agrochimica* 32: 245-252. *Ídem,* 1988: «III. Fertilizer solubility in soil Columns». *Agrochimica* 32: 253-261.

(16) JIMÉNEZ, S.; CARTAGENA, M.ª C.; VALLEJO, A., RAMOS, G. (1989): «Coated urea with rosin and tricalcic phosphate I. Influence of distinct factors in the solubilization rate». *Idem*, «II. Behaviour in soil columns». *Agrochimica* 33: 275-282.

(17) CARTAGENA, M.ª C.; DÍEZ, A.; VALLEJO, A., JIMÉNEZ, S. (1992): «Evaluation and classification of slow-release coated nitrogen fertilizers by means of electroultrafiltration in an integrated system». *Fertilizer Research*.

(18) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (2004): «La conservación del suelo, base de su sostenibilidad y soporte de la salud». Discurso Leído en la Solemne Sesión Inaugural del Curso el 22 de enero de 2004. *Real Academia Nacional de Farmacia,* 78 p.
(19) JIMÉNEZ, S. *et al.* (1992): *Fertilizantes de liberación lenta*. Ed. Mundo-Prensa, Madrid, 176 p.
(20) ID. (1991): «Los residuos de origen vital: ¿problema o recurso? Discurso para el ingreso como Académico de Número en la Real Academia de Farmacia», 131 p., p. 107. *Ídem,* 1992. *Química e Industria*: 38: 265-271.
(21) ID. «Fertilizantes y Medio Ambiente». *Bol. Agropecuario,* 23: 4-9.
(22) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1992): «Aprovechamiento de residuos de origen vital». *Política Científica*: 32: 3-14, mayo.
(23) ID. «La contaminación por residuos agrícolas». *Nueva Revista* 24: 94-98.
(24) ID. (1993): «Materia orgánica para una agricultura sostenible». *Bol. Agropecuario* 29: 13-17.
(25) ID. (2002): «Antecedentes y objetivos del Sexto Programa de Acción Ambiental», en *La salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la U.E.* («Foro de reflexión y difusión del conocimiento»). Instituto de España - Real Acad. Nac. Farm. *Monografía XI*, pp. 19-44, p. 41.
(26) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (coord.) (2000): «Ética y educación ambiental: recursos imprescindibles», en *Salud, educación y energía: Recursos cualificados para el siglo XXI*. Real Acad. Farm. *Monografía VII,* 15-20 y 229-250, p. 249.
(27) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (2000): «El agua, un recurso agotable». *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* Vol. LXVI: 417-432.
(28) VIÁN ORTUÑO, A. (1991): En JIMÉNEZ GÓMEZ, S. «Discurso para su Ingreso en la Real Academia de Farmacia como Académico de Número». Instituto de España - Real Acad. Nal. Farm. *Monografía,* Madrid, 1991, 131 pp.
(29) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1998): *El agua como problema*. Colegio Libre de Eméritos y Fundación Alfonso Martín Escudero, Madrid.
(30) JIMÉNEZ GÓMEZ, S., JIMÉNEZ GARNICA, F. (2003): «VI. Desarrollo sostenible en la producción alimentaría», en *Temas escogidos de seguridad alimentaria*. Instituto de España-Real Academia Nacional de Farmacia. *Monografía XIII,* pp. 189-214.
(31) ATKINS, P. (2003): *El dedo de Galileo. Las diez grandes ideas de la ciencia*. Espasa Calpe, S. A., Madrid, 436 p.
(32) VIAN, A. (1974): En JIMÉNEZ GÓMEZ, S., *Contestación al discurso para su ingreso como Académico Correspondiente en la Real Academia de Farmacia,* Madrid, p. 23.
(33) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1997): «Ciencia y Humanismo en el Doctor Carpena». Sesión Necrológica en Homenaje al Profesor Octavio Carpena Artés. *R. Acad. de Farm*., sept., pp. 3-13.

Segundo Jiménez Gómez, Académico eficaz

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Doctor Reol Tejada; Excma. Secretaria de la Academia, Profesora Francés; Excmos. e Iltmos. Señoras y Señores Académicos; Excma. Señora Ana María de Garnica y Oncins, viuda de Jiménez; hijos y nietos del Profesor Jiménez, Señoras y Señores.

Mi gratitud a la Junta de Gobierno de nuestra Academia al confiar en mí, junto con nuestros compañeros los profesores López Mateo y González González, la representación de la Academia en esta necrológica rememoratoria del Doctor Jiménez Gómez, ilustre Catedrático de la Universidad Politécnica de Madrid, compañero Académico y amigo de todos, en la que lo protocolario queda inevitablemente postergado por el pesar que nos embarga, ante la temporal separación de quien, por su modo de ser y de hacer, amabilidad y cortesía, se granjeó nuestro respeto y cariño.

El Profesor Jiménez, académico

Estamos acostumbrados a considerar a la Academia como una Institución científica y, como dijo una vez nuestro Presidente, un foro de reflexión. Las Academias comparten con la Universidad el gozo de aprender y de enseñar, de buscar la verdad, de descubrirla y de comunicarla en todos los campos del conocimiento. A estas nobles finalidades debo añadir que la Academia es un ámbito de amistad. Yo, y creo que todos, venimos a nuestras sesiones, además de a escuchar y de aprender magníficas conferencias y comunicaciones y a departir sobre ellas, a ejercer la amistad, a esponjarnos con

ella, como lo prueba el que nos hayamos congregado esta tarde como homenaje póstumo a los méritos científicos y académicos del Profesor Jiménez, que nos permite además a exteriorizar la amistad que a él nos unía. ¡Qué hermosa es la muerte que nos permite reconocer las virtudes de los que nos han precedido en ella! El Profesor Jiménez ingresó en nuestra Academia como Académico Correspondiente en 1974 y como tal cumplió fielmente con sus obligaciones. Quiero recordar, nuevamente, para animar a los que la Academia admitió en su seno y a los que aspiran a serlo como Académicos Correspondientes, la importancia, la categoría y la dignidad del cargo de Académico Correspondiente, que son iguales a los de número, salvo para las menos gratificantes tareas de dirección y de gestión. En 1991, el Profesor Jiménez fue elegido Académico de Número después de una votación, cuyo resultado, que creo insólito, fue el unánime aplauso de los Académicos. En el acto de su recepción el 5 de diciembre de 1991, que lo hacía miembro del Instituto de España, leyó un enjundioso discurso titulado: «Los residuos de origen vital, ¿problema o recurso?», en el que hacía una exposición completa de lo que suponían los residuos de origen agrícola y ganadero; desde ese momento volcó toda su energía, su sabiduría y su tiempo a la Academia, lo que cumplió con creces. Además de la contribución científica que el Profesor Jiménez desarrollaba en la Academia en sus Conferencias, lecciones, Monografías y artículos publicados en los Anales, formó parte, debido a sus dotes de dar siempre buen consejo, de numerosas comisiones y grupos de trabajo de esta casa por lo que fue, además de Presidente de la Comisión de Hacienda, miembro de la Directiva y de la Junta de Gobierno, y especialmente ostentando el cargo de Tesorero de la misma en el que, como en todas las facetas de su vida, el Académico Tesorero Doctor Jiménez desplegaba, aunque parezca mentira imaginación, señorío, seriedad y tesón a la Tesorería. He sido testigo de las muchas horas de trabajo y preocupación llevadas a cabo por el Doctor Jiménez bajo las presidencias de los Doctores Cadórniga, Reol Tejada y Rodríguez Villanueva, para lograr la eficacia y transparencia necesaria en esa tarea.

Es evidente que Segundo ha sido el arquetipo de profesor perfecto, no sólo en la Universidad, en la Academia y en los demás ámbitos en los que desarrolló su docencia. El Profesor Jiménez, auténtico maestro, que es mucho más, con serlo mucho, que profesor, ejerció

como Catedrático de Universidad, máxima categoría docente, a la que se ha querido y se sigue intentando desprestigiar por los pedantes y arbitristas. El Profesor Jiménez tenía la vocación de la docencia y aquí siguió, con la siembra fecunda de la misma, enseñando y formando a los estudiantes que, libres de la necesidad de aprobar, seguían animados por el amor al saber, recibiendo las enseñanzas del maestro. Segundo no sólo sabía, sino que sabía demostrarlo, lo que para Baltasar Gracián era valer dos veces. Enseñaba al transmitir sus conocimientos, pero sobre todo con su actitud ante la ciencia y la vida. En sus clases y disertaciones despertaba interés y curiosidad, ya que como dijo Anatole France: «el arte de enseñar no es otra cosa que el arte de despertar la curiosidad». Un maestro es siempre el transmisor del pensamiento y de las ideas, capaz de mantener latente el rescoldo que alimenta permanentemente la laboriosidad y del que surge la llama que ilumina la creatividad. Segundo amaba a la Universidad, en la que se había formado y a la que se incorporó como profesor, una Institución comprometida con la verdad, que crea Ciencia, que cultiva la razón, el método y la crítica. Una característica de la docencia universitaria es que siempre se enseña a jóvenes que se van renovando continuamente de promoción en promoción, año tras año sin envejecer. La permanente juventud de sus alumnos rejuvenecía a Segundo y lo mantenía joven de espíritu en la Universidad Politécnica de Madrid y en los Cursos de Verano de la Complutense. En esa misma línea de vocación docente deseo destacar ante ustedes la tarea docente que desarrolló en Lanzarote al igual que hicieron numerosos académicos. Nuestro compañero, el Académico Correspondiente, Profesor González de Posada, había, además de haber creado una importante Academia Científica, «de las Ciencias y las Ingenierías», organizado durante nueve veranos un total de 270 cursos sobre muy diversos y siempre importantes temas que habían llegado a constituir una auténtica Universidad, que llevó a esa interesante isla, el espíritu universitario, del que por su aislamiento adolecía. En esa Universidad tuve el privilegio de impartir con el Profesor Jiménez, durante tres veranos, una serie de cursos dirigidos especialmente al ambiente y a sus efectos sobre la salud; nos repartíamos los temas, no de acuerdo con nuestro conocimiento de los mismos, pues en todos ellos me aventajaba Segundo, sino de lo que considerábamos más conveniente para los alumnos; cuando yo no había aún empezado a redactar mis temas, Segundo ya tenía

los suyos perfectamente acabados sin dejar ningún cabo suelto; sus esquemas, que convertía en transparencias, eran un prodigio de concisión sin que quedaran fuera de los mismos aspectos esenciales. Un auténtico docente. Durante las respectivas clases repasábamos en el aula el siguiente tema, pero a menudo mi atención se polarizaba en las cosas tan interesantes que estaba exponiendo Segundo. Pero mi recuerdo más vivo de aquella convivencia eran nuestras conversaciones entre clase y clase y sobre todo en el foro de intercambio de ideas que manteníamos en la furgoneta que nos trasladaba a un grupo de profesores desde nuestro hotel en el Puerto del Carmen a los Centros Universitarios de Arrecife. En esa labor docente del Profesor Jiménez debo recordar los numerosos cursos diseñados y dirigidos en esta Real Academia por él y los muchos en los que participó. Segundo justificó la máxima de Séneca de que «enseñando se aprende». Sus clases teóricas y sus conferencias, que pude aquí escuchar, estaban llenas de contenido, preparadas concienzuda y minuciosamente y basadas en su experiencia y en su bagaje bibliográfico más reciente, eran expuestas de forma clara y sencilla; eran siempre auténticas lecciones magistrales que captaban enseguida el interés de todos sus oyentes, transmitiendo sus ideas, perspectivas e ilusiones.

La docencia es una cadena en la que cada eslabón recoge la sabiduría de sus maestros y a su vez la entrega a sus discípulos, como refleja la bella estatua de la Ciudad Universitaria de Madrid. El eslabón de maestro de Segundo estaba fervorosamente ocupado por nuestro recordado compañero de Academia, el Profesor Vián Ortuño, a quien siempre mostró gratitud y admiración. No se puede decir del Profesor Jiménez, parafraseando la conocida frase referida al Cid: «!Qué buen vasallo si hobiera buen señor!» Porque Don Segundo Jiménez fue muy buen discípulo y se honraba en ello. Hay que aprender a ser discípulo para ser maestro, y el Doctor Jiménez fue un gran maestro porque fue un magnífico discípulo. En el cariño y la gratitud debida al maestro Segundo también cumplió. La deferencia, el respeto, las atenciones que Segundo prodigaba a Ángel Vián eran continuas y emocionantes; las visitas que frecuentemente le hacía durante su enfermedad, las cuales le fueron a Ángel Vián muy consoladoras y le sirvieron de viático espiritual que, estoy seguro, ya le ha agradecido. En el eslabón siguiente en esa imagina-

ria cadena de la transmisión de conocimientos están sus discípulos a los que se intenta transfundir un hacer y un pensar impregnado de un estilo peculiar. Los discípulos con el maestro componen un binomio indisoluble. Esa capacidad de ser maestro y discípulo sólo la tiene un maestro, al igual que la de ser discípulo y maestro sólo la tiene un buen discípulo. Con sus discípulos el Profesor Jiménez ha creado una escuela, que irradia ciencia, conocimientos y sobre todo un saber ser y estar, constituyéndose en la argamasa que unía a sus componentes basada en su común categoría personal, el deseo de la excelencia, huyendo de la mediocridad, con entrega total, con la única recompensa de aprender y con el respeto y afecto hacia el maestro. Actualmente nadie quiere ser discípulo racionalizando ese fracaso, negando la existencia de maestros. Innumerables han sido los discípulos del Profesor Jiménez, pero los apóstoles sólo fueron doce y los cristianos, rápidamente fueron legión, es decir, que las enseñanzas y ejemplo del maestro fructifican en los discípulos de los que fueron los suyos. De los que yo sabía más íntimos, los que organizaron hace poco un íntimo homenaje en un, no céntrico, restaurante de Madrid, destaco a los profesores Federico López Mateos, María del Carmen Cartagena Causapé, Ernesto Castañeda Martín, María Isabel Rico Selas y María Dolores Climent. Una gratitud añadida a Segundo ha sido conocer y poder apreciar a estos amigos.

El Profesor Jiménez, sanitario

Segundo era un químico vocacional, lo que equivale a un químico excepcional, y sus conocimientos químicos los aplicó a la salud. Se suele considerar sanitarios a los profesionales que trabajan sobre la enfermedad, y así lo son claramente el médico, farmacéutico y el veterinario, pero en realidad sanitarios son todos los profesionales cuyo objetivo es la salud de la población, y en este sentido lo son o lo deben ser todas las actividades humanas; los biólogos, los físicos, los ingenieros, los químicos, y no digamos los políticos, ya que pueden hacer más por la salud de la humanidad que los que trabajan más directamente en este campo.

La salud es un componente, una resultante de la interacción de factores agrupables en genéticos, sociales y ambientales. Una ama-

ble discusión que confieso me gustaba entablar con Segundo, era la expresión de «medio ambiente», anfibólica y tan pedante que hasta tenemos un Ministerio con esa denominación. Pero dejando aparte la denominación, los vastos conocimientos sobre la química industrial o de la ingeniería química del Profesor Jiménez le hacían en nuestra Academia referencia obligada para todos los temas relativos al ambiente. Como ejemplo del interés del Profesor Jiménez por el medio debo destacar el Ciclo titulado «Salud y Medio Ambiente», desarrollado en 2002 en la Universidad de Verano de Lanzarote. Segundo estuvo siempre atento a los acontecimientos políticos que tenían relación con el medio, tales como el agua, y aquí destaco la Conferencia titulada «Contaminación del agua urbana», dirigida al «Grupo Especial Directivos» en 1995 o sobre los «Residuos. Aspectos éticos ante el problema de los residuos», Real Academia de Farmacia (1995). Igualmente el Profesor Jiménez aportó sus importantes investigaciones a la mejora del ambiente con sus trabajos y publicaciones que rezaban estos títulos: «Desarrollo de tecnologías de liberación lenta, de aplicación en agricultura y en farmacia», «Fertilizantes de liberación lenta con recubrimiento de colofonía y fosfato tricálcico», «Descontaminación metálica de aguas por extracción. Empleo de colofonía como nuevo reactivo natural de extracción», «Desmetalización de lodos de depuradoras para eliminar su toxicidad», «Tratamiento de residuos agrícolas con fines descontaminantes, recuperación energética y obtención simultánea de compost para conservación de suelos sin riesgos sanitarios tóxicos».

Otra faceta eminentemente sanitaria a la que dirigió su atención han sido los alimentos y, como muestra, recito las Conferenias que sobre este tema ha desarrollado, tales como la «Ingeniería de los alimentos», expuesta en 1989 en el Colegio Libre de Eméritos y otra en nuestra Academia, y la titulada «Cuestiones nutritivas de actualidad», Real Academia de Farmacia (1997) y «Cuestiones alimentarias de actualidad» y en esta casa en 2000. Gran parte de los problemas ambientales se derivan de la actividad industrial y de la política. Segundo se ocupó del «Análisis crítico de la civilización tecnológica», en sendas magníficas conferencias desarrolladas en 1994 en el Colegio Libre de Eméritos, y en 1995 en la Real Academia de Farmacia, y la «Ciencia y la educación en la promoción de la salud», igualmente en la Real Academia de Farmacia en 1997, la «Difusión

del conocimiento científico» en 1998 en la Real Academia de Ciencias, «El reto de los recursos en el siglo XXI». Curso de Verano de la UCM en 1999 en El Escorial y la «Proyección social de la ciencia» en 2000 en la Universidad Menéndez Pelayo, Santander. «La salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la UE» y «Temas escogidos sobre promoción de la salud» en la Universidad de Lanzarote en 2003. Consciente del riesgo potencial que los productos químicos pueden suponer en una guerra, se ocupó de los agresivos incapacitantes, axfisiantes y vesicantes en noviembre de 2003.

Además de sus Conferencias, el Doctor Jiménez ha dirigido en la Academia muy interesantes cursos que se concretaron en Monografías, como la que recoge el «Curso de seguridad ambiental» en 1996, el de «Salud, educación y energía» en 2000 y el de «Seguridad alimentaria» en 2001.

Otro campo de gran interés para el Profesor Jiménez fue el cambio climático. La temperatura de la superficie de nuestro planeta, muy relacionada con el clima, es la diferencia entre la energía que recibe del sol y la mínima transmitida del magma interior y la que irradia al espacio exterior; esa temperatura sería de –18º C si no existieran en nuestra atmósfera gases de efecto invernadero, especialmente el vapor de agua y el dióxido de carbono que retienen la energía térmica, permitiendo que la temperatura media de la superficie de la tierra sea de unos 15º C. Las actividades humanas asociadas al desarrollo agrícola y económico y al crecimiento demográfico han modificado la composición natural pre-industrial de la atmósfera, debido a la producción de gases que intensifican el efecto invernadero. La concentración atmosférica en 1990 del dióxido de carbono ha aumentado un 30%, los de metano un 145% y los óxido nítrico un 15%, respecto a los de la segunda mitad del siglo XVII antes de la revolución industrial. Estos aumentos han llevado a que la ONU convocara para 1972 la Conferencia sobre Ambiente de Naciones Unidas celebrado en Estocolmo, creando, en 1988, el Grupo de Expertos Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) y elaborando una Convención Marco sobre el Cambio Climático (CMCC), aprobada en 1992 en la Conferencia de Naciones Unidas sobre Ambiente y Desarrollo, conocida como Cumbre de Río. La Convención entró en vigor en marzo de 1994, tras su ratificación por parte de 159 países, y ha alcanzado su mayor grado de popularidad

y efectividad con los acuerdos suscritos en el Protocolo de Kioto durante la Tercera Conferencia de las Partes en 1997, cuyo objetivo final fue reducir las emisiones globales de los gases más importantes en un 5,2% durante el promedio 2008-2012, con relación a las emisiones de 1990.

El riesgo del cambio climático emerge como una importante amenaza que ya ha lanzado avisos con los recientes cambios climáticos regionales que han influido en muchos sistemas físicos y biológicos, como han sido los aumentos de inundaciones y sequías y otras catástrofes, algunos irreversibles. Por ello el Profesor Jiménez se ha ocupado profundamente de este problema y sus soluciones a través de la importante óptica de la química, e insistiendo en educar a la población, que es simultáneamente víctima y agresor, y que debe implicarse solidariamente para suprimir ese riesgo. Segundo hizo suya la expresión de White, que parafraseamos así: «Si la Tierra fuese un televisor, el capítulo del clima de su manual de instrucciones debería subrayar que el mecanismo había sido ajustado en fábrica para un funcionamiento óptimo, por lo que no se debe alterar los mecanismos».

Personalidad

Pero la figura del Doctor Jiménez, cuyas facetas académica y docente estoy glosando, está encarnada en un hombre del cual no se puede disociar. Segundo era perfeccionista en el sentido de que quería ser cada vez mejor y que su quehacer lo fuera; con Unamuno pensaba que «el que no siente ansias de ser más, llega a no ser nada». Segundo sabía de lo que era capaz y aun más, quién era y para qué estaba en el mundo. Él, como aconsejaba Justus von Liebig, en una carta dirigida a Charles Frederic Gerhard: «Apuntad a un fin elevado y los honores llegarán sin que tenga uno que tomarse el trabajo de buscarlos». Fray Luis de Granada dejó escrito: «Cuando el apoyo es más graciable, tanto más deja al hombre obligado», pero los premios recibidos por el Doctor Jiménez, entre los que resalto el Primer Premio de Investigación Técnica sobre Medio Ambiente otorgado por el Ayuntamiento de Madrid en 1987, los honores y condecoración que recibió Segundo, no eran graciables, sino de justicia,

pese a lo cual se mostró agradecido a quienes se los otorgaron, los cuales se honraban a si mismos con la justicia con la que los concedieron a Segundo. Segundo no trabajaba en pos de honores ni de gratitudes, sino movido por su elevado sentido del deber. Su categoría humana supera, si cabe, a sus méritos científicos. Generalmente concedemos a estos a la situación social o académica y de verdad, lo que queda es el calor de la amistad encendido por las cualidades humanas.

Hombre de convicciones profundas basó su vida en su compromiso con ellas, teniendo siempre presente los más altos valores en los que fue educado y en los que profundizó para ser mejor con sus semejantes, que es el mejor modo de serlo consigo. En sus relaciones sociales Segundo no utilizaba la violencia, ni en el dominio de la fuerza para resolver conflictos, sino el diálogo basado en la razón, porque, desde la época de Sócrates, el pensamiento y la reflexión necesitan ser impulsadas por el diálogo racional y la discusión crítica.

Segundo infundió en su vida el cristianismo, asume la antropología bíblica para enseñarnos a ser «verdaderamente un hombre». San Agustín lo expresó: «Más grande que cualquier milagro que Dios pueda hacer a favor del hombre es el hombre mismo». El hombre está hecho para Dios, lo que Zubiri llamó *religatio,* ligazón honda y sustancial, llamado a una plenitud de vida presente y futura». Concretándome al Doctor Jiménez como Académico y aunque no sé si tengo derecho a divulgar cosas y hechos que conozco de Segundo a través de confidencias, pero pienso que si él confió en mí, simplemente por ser su amigo, en esa categoría estáis todos incluidos. Con ese espíritu como buen discípulo en sus continuas visitas a su maestro enfermo le hacía ver que la vida no termina con la muerte, que ese conocimiento no es un consuelo para ignorantes, un opio para desesperados, sino la culminación de la Creación; fui testigo de la alegría de Segundo al ir comprobando que el descreimiento de su maestro era más superficial que real. En nuestras conversaciones hablábamos de todo, hasta de política. Una frase que me impactó en el curso de una conversación sobre la relación del hombre con Dios: «Si Jesús no hubiera sido Dios, su ejemplo debería ser aún más meritorio y valioso para nosotros».

El trabajo y Segundo

Me pareció oportuno recordar alguna característica que a Segundo le hubiera agradado que yo mencionara y por ello pregunté a su mujer, Ana María, nuestra amiga, qué faceta vital debería destacar; sin titubear me dijo que su amor al trabajo, que el trabajo era su norte y su guía, «superior al que tenía a su familia». Más de una vez oi eso mismo de mi mujer, y probablemente ese alegato lo hayamos oído casi todos. Pero esa, digamos acusación, no es cierta. El amor al trabajo, la satisfacción del deber cumplido, de la obra bien hecha, está indisolublemente unido el amor a la familia. Hasta los honorarios, con los que a veces se compensa nuestro trabajo, redundan en nuestra familia. Cuando llegábamos tarde a casa, cansados del trabajo universitario, lo prolongábamos en el hogar, preparando la clase del día siguiente, no abandonamos a la familia: ella estaba en los libros, en los tubos de ensayo, en las sesiones científicas, aunque no se notara, aunque no se expresara. En este caso concreto he sido testigo del amor de Segundo a su familia, a vosotros, querida Ana María, que yo tal vez por tener mi sensibilidad aumentada, apreciaba en mil detalles. Pero tenemos la propia confesión de Segundo que en su discurso de ingreso: «Ahí están mi mujer, Ana María, y mis hijos: ellos son los auténticos acreedores del tiempo que yo he dedicado a tesis, tesinas, publicaciones, trabajos y memorias de oposición. Ellos no han tenido la compensación de sentirse autores y ni siquiera les he dedicado esa convencional frase de reconocimiento con la que cortésmente se agradece una colaboración. Pero, es más, ellos no sólo han sido pacientes y silenciosos, sino también entusiastas animadores de mis empeños universitarios y científicos. Por ello, mi recuerdo no sólo es de gratitud, sino de justicia».

El año 2004 fue un *Annus horribilis* para nuestra Academia en el que se produjo el fallecimiento de cinco Académicos de Número. Similarmente a la «Comunión de los Santos», la Academia tiene su tesoro: los Académicos que nos han precedido y cuyas pérdidas hemos sufrido pero que nos han dejado su obra y ejemplo y que contribuyen al Tesoro espiritual de nuestra Institución. Por todo ello en esta tarde de reconocimiento a nuestro compañero deseo transmitir nuestro pesar, pero también nuestra felicitación a la familia en la que nació y educó, representada en sus hermanos y especialmente

a la familia que él formó; a su esposa Ana María de Garnica y Oncins, a sus hijos José Ramón, Ana María, Reyes y Fernando, y a sus nietos en quienes tanto se complacía. Este pesar deseo concretarlo en el patetismo de una nieta, una adolescente llorando desolada y calladamente en el tanatorio.

He dicho.

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 991-1040

Necrológica

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz

El Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz nació el día 19 de julio de 1912 en Reinosa (Cantabria). Tomó posesión como Académico de Número el día 16 de junio de 1941 de la Medalla número 27. Falleció el día 23 de marzo de 2005. La Sesión Necrológica se celebró el día 3 de noviembre de 2005, participando los Excmos. Señores Académicos Don José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Don Federico Mayor Zaragoza, Doña María Cascales Angosto, Don Bartolomé Ribas Ozonas, Doña María Teresa Miras Portugal y Doña Ana María Pascual-Leone Pascual. Fue presidida por los Excmos. Señores Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y Don Amador Schüller Pérez, Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina.

Don Ángel Santos Ruiz: Profesor y Maestro

JOSÉ ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina,

Excma. Señora Doña María Carmen Díaz y restantes miembros de la familia Santos Ruiz,

Excmos. Señoras y Señores Académicos,

Distinguidos compañeros,

Señoras y Señores:

Permítanme que en este acto —para los aquí presentes tan lleno de emoción y sentimiento— comience empleando algunas palabras pronunciadas por el Académico don Ángel Santos Ruiz, «en este histórico salón, mudo testigo de importantes sesiones académicas» (1), según él decía en la sesión necrológica del 10-XI-1994 dedicada al que fue académico de número, Profesor **Alfredo Carrato Ibáñez,** sobradamente conocido y apreciado en esta Corporación. Decía entonces Don Ángel —y me tomo la licencia de hacer mías sus palabras— lo siguiente: «Al dirigirme hoy, y ahora, a tan distinguido auditorio, me confieso profundamente apenado por el motivo que me autoriza a ocupación tan relevante [...], y quizá inmodestamente figura entre mis aspiraciones la de representar no sólo a esta Real Academia de Farmacia sino también a un denso núcleo de amigos y compañeros» (2).

I

Como estudiante en la entonces nueva y siempre acogedora Facultad de Farmacia madrileña de la Ciudad Universitaria de finales de la década de 1940, yo «conocía de vista» la prestigiosa figura del joven Catedrático de Bioquímica, siempre elegantemente vestido, a menudo con trajes de franela gris (de bien cortada chaqueta cruzada), confeccionados con finos paños que —luego supe— procedían de las acreditadas fábricas bejaranas pertenecientes a su distinguida familia política.

Realmente, mi primer contacto con él tuvo lugar en una mañana de comienzos de octubre de 1950 —cuando Don Ángel contaba tan sólo treinta y ocho años—, en uno de esos días en que desde nuestra Facultad se divisaba la cara sur de la sierra madrileña con toda su pureza cromática pintada por Velázquez, y se gozaba de la suave temperatura propia del luminoso y prolongado otoño típico de esta Villa y Corte.

En el aula, en la primera clase de «Bioquímica Estática», tomábamos rápidamente notas numerosos alumnos entre los que venían destacando algunos como los hoy Académicos **Manuel Losada, Gonzalo Giménez, Julio Rodríguez Villanueva, Manuel Ruiz Amil,** además de quien era para todos nosotros asesor y amigo: el malogrado **Avelino Pérez Geijo** (fallecido en la década de 1970).

Muy a comienzos de octubre de 1951 —pues Don Ángel no perdía ni un día entre el de la inauguración oficial del curso académico y el de su primera clase—, iniciábamos el estudio de la «Bioquímica Dinámica», en el sexto y último año de carrera. Al terminar su explicación —después de despedirse Don Ángel con su frase habitual: «y el próximo día continuaremos»— dijo (tengo entendido que por sugerencia previa de su colaborador y enseguida Catedrático **Vicente Villar Palasí):** «Dos de ustedes, que tengan buen expediente y deseen hacer el doctorado en esta Cátedra, pueden venir ahora a mi despacho».

Y al sobrio, ordenado, bien amueblado y repleto de libros despacho de Don Ángel acudimos otro compañero —**Jesús Bermejo**— y quien les habla, que no estábamos —a diferencia de otros colegas— vinculados mediante ningún compromiso (tácito ni explícito) ni

comprometidos con otros profesores, y habíamos obtenido Sobresaliente en Bioquímica Estática (aspecto este que debió de satisfacer a nuestro profesor). Y ruego disculpen lo siguiente, por ser relativo a mí mismo: Don Ángel me asignó para trabajar (con total autonomía) un pequeño pero independiente laboratorio, situado al extremo del ala derecha del Departamento.

Así comencé a colaborar con el Profesor Santos Ruiz, hace ya cincuenta y cuatro años... Desde entonces, él ha sido para mí —y para otros— un firme apoyo, modelo y guía profesional; que, en mi caso, lo ha sido también en el importante orden afectivo. Durante este más de medio siglo, nuestro afectuoso contacto nunca se ha visto enturbiado ni jamás interrumpido.

Pero esta prolongada comunicación entre ambos no constituye, obviamente, ningún mérito mío, ya que Don Ángel ha podido señalar que con él «han trabajado, en pluralismo constructivo, licenciados en Ciencias en sus diversas ramas, en Farmacia, en Medicina y en Veterinaria; cristianos y agnósticos, judíos y musulmanes» (3).

II

Atrevido e inútil intento sería por mi parte el tratar de comentar aquí, ahora, las extraordinarias **cualidades humanas** y los numerosísimos méritos que concurrieron en el Profesor Santos. Al no poder detallarlos, me tranquiliza el saber que son conocidos (esencialmente al menos) por los aquí presentes y por otras personas.

No obstante, estimo que sí deben ser destacadas hoy, aunque sea brevemente, *algunas facetas* como las siguientes, relativas a:

— Su personalidad humana.

— Sus actividades, estrechamente relacionadas entre sí, como Profesor y como Decano.

— Sus logros como Director de un importante laboratorio farmacéutico madrileño.

— Su labor como escritor preocupado por temas de tipo ético o filosófico, tratados por él desde una perspectiva religiosa, católica y científica.

— Su función como consejero o asesor en el Ministerio de Educación —denominado certeramente de «Educación y Ciencia» durante algunos años, por iniciativa de otro muy insigne académico de esta Corporación, ya fallecido, el Profesor **Don Manuel Lora Tamayo—,** institución con la que prolongadamente colaboró Don Ángel y cuyo comentario no procede hacer aquí, ahora.

Deliberadamente, prescindiré también de realizar un análisis de su fecunda labor investigadora, a su vez íntimamente relacionada con su actividad como máximo representante de la Bioquímica española en organismos internacionales, logrando su gestión superar las barreras de aislamiento sufridas por nuestro país en la posguerra europea, gracias a su relación con el insigne Profesor **J. E. Courtois** (de París) inicialmente, y seguida esta conexión mediante la establecida con numerosas naciones europeas y americanas; hasta que Don Ángel cedió voluntariamente el desempeño de tales puestos a otras personas que han proseguido acertadamente su labor.

Tampoco abordaré el comentario de su ingente obra en relación con esta Academia y con la de Medicina. Sus facetas investigadora y estrictamente académica o la religiosa, así como su decisivo papel como cofundador de la inicial Sociedad Española de Bioquímica a comienzos de la década de 1960 y otras serán hoy brillantemente tratadas por sus también discípulos Académicos Doctores **Federico Mayor Zaragoza, María Cascales, Bartolomé Ribas, M.ª Teresa Miras** y **Ana M.ª Pascual-Leone,** respectivamente.

III

En relación con la *faceta docente* del Profesor Santos Ruiz, permítaseme indicar, siquiera sea con brevedad, algunos aspectos como los siguientes:

1.º La *altísima calidad de sus clases teóricas*, expuestas con rigor científico, claridad y rapidez, con visión integradora de los temas y complementadas con el comentario del contenido de tablas pacientemente escritas de antemano en las amplias pizarras laterales —pues la pizarra central quedaba reservada para los esquemas o

fórmulas que desarrollaba durante la explicación—, o mediante diapositivas.

Aunque fiel a su norma de que «al alumno el detalle del problema no le interesa tanto como el conocimiento de conceptos genéricos, de los que debe darse cuenta con interpretación y visión ajustada» (3), el hecho es que lograba exponer tan exhaustivamente los temas —a veces complicados— de ambas Bioquímicas que resultaba innecesario, por inútil, el intento de algunos (pocos) alumnos de ampliar conocimientos mediante la consulta de tratados o textos (entonces no tan numerosos y más áridos que los de ahora). Esto no sucedía con ninguna otra asignatura. No hay que olvidar que, para la obtención de altas calificaciones, solía ser aconsejable la consulta de obras existentes no sólo en la bien dotada biblioteca de la Facultad sino también en la Biblioteca Nacional.

Retrospectivamente, pienso que el alto nivel de las clase de Bioquímica podría deberse asimismo a que Don Ángel incorporaba en sus exposiciones conceptos de las asignaturas de Medicina, cuya carrera él estaba estudiando, por libre, en aquellos años, en la famosa Universidad de Salamanca. Más que obras generales de Bioquímica, sí nos eran útiles, no obstante, monografías, como las escritas por el propio Catedrático, tales como las relativas a hormonas (del año 1940), vitaminas (1941), hidrocarburos (1943), fermentos (1944), bioelementos (1946), o su traducción acerca de los lípidos (1950), etc.

Más tarde, ya apareció un «Tratado de Bioquímica» del que era coautor Don Ángel. En efecto, desde la primera edición de un libro español de Bioquímica que fue el del *iniciador* de esta ciencia en nuestra nación —el Profesor **Don José Rodríguez Carracido—** en el año 1903 —muy ampliado en su segunda edición de 1917—, escasísima fue la producción y, por tanto, la utilización de obras para la enseñanza de la Bioquímica que no fueran traducciones, en la primera mitad del siglo XX. Poco después, sí surgirían bastantes traducciones, de las que merece ser destacada la realizada fielmente por nuestro compañero Profesor **Bernabé Sanz;** si bien Don Ángel nos recomendaba beber de las fuentes originales, como él hacía.

En la década de 1960 el panorama cambió, cuando llegó a Barcelona como Catedrático el inteligente Don Vicente Villar; quien, carente de laboratorio bien dotado en un principio, pudo aprovechar

aquella etapa inicial de su fecunda estancia en Cataluña redactando en forma de texto el abundantísimo material didáctico que, muy elaborado, le suministró Don Ángel. A las ediciones de «Tratado de Bioquímica» aparecidas en 1961, 1965, 1968, y 1971, sucedió la última, de 1977 —ya fallecido Vicente Villar—, en la que tuve el honor de figurar como coautor juntamente con ambos maestros.

Sinceramente, creo que bajo la dirección del Profesor Santos, «sí se han llegado a "crear vigorosas síntesis y sistematización del saber para enseñarlo"», como preconizaba **Ortega** con acierto en su discutida obra «Misión de la Universidad»; y ello se logró «gracias al "talento integrador" del titular de tal Cátedra» (4).

A pesar de lo que a veces se dice y se repite, según afirmaba la prestigiosa y nada sospechosa figura del Profesor **Pedro Laín Entralgo** en diciembre de 1977 en Salamanca, «no todo en nuestra Universidad fue erial o ignorancia en los últimos cuarenta años [entre 1977 y aproximadamente 1939]. Continuando como pudieron una tradición minoritariamente iniciada a finales del siglo XIX y creciente en anchura a lo largo del siglo XX, no pocos de sus profesores enseñaron sus disciplinas al día, y algunos de ellos (...) supieron edificar una obra más que presentable» (5).

Fácilmente puede deducirse que entre estos modélicos profesores se hallaba el Catedrático Santos Ruiz.

2.º Otro aspecto relacionado con la docencia de dicho profesor es el de la *atención cuidadosa que concedía a sus colaboradores* (Adjuntos y Ayudantes). Dándonos plena autonomía y responsabilidad, alentándonos a introducir algunas innovaciones, él estaba al corriente de la calidad de nuestras clases. A veces, esta información le fue facilitada espontáneamente por Delegados de Curso, como (en mi etapa de Adjunto) sucedió con nuestro actual colega de Academia **Emilio Muñoz Ruiz.**

A los Adjuntos nos asignaba impartir las clases de los miércoles, empezando por los temas de glúcidos, inicialmente de la Bioquímica Estructural y luego de la Metabólica, haciéndonos cambiar en cada nuevo curso a los restantes capítulos. Así pudimos adquirir la máxima experiencia docente en relativamente poco tiempo, que permitiría afrontar aceptablemente el desarrollo de la siempre temida «lección del encierro» correspondiente al cuarto ejercicio de las rigurosas

oposiciones a cátedra, en la que solían naufragar quienes habían realizado mayoritariamente labor investigadora en detrimento de la docente.

3.º Siendo Decano de la Facultad de Farmacia madrileña el prestigioso (y entonces anciano) Catedrático —también Director que fue de esta Real Academia— Don **José Casares Gil,** fue elegido *Vicedecano* el joven Catedrático Santos Ruiz; y, jubilado aquél, en 1951 fue elegido *Decano* Don Ángel, quien desempeñaría el cargo durante quince años mediante sucesivas y unánimes reelecciones celebradas cada tres años, hasta que voluntariamente renunció y fue nombrado *Decano honorario* a propuesta del Claustro.

No siempre debió de resultar sencillo al animoso Decano conseguir que la Facultad funcionara adecuadamente, dadas las dificultades de la época (con restricciones eléctricas, falta de aparatos y reactivos, etc.). Recuerdo que gestiones personales de Don Ángel lograron vencer la resistencia de algunos (pocos) colegas que intentaron escudarse en la ausencia o escasez de medios materiales o personales para no impartir alguna asignatura de Doctorado o las prácticas correspondientes. Frente a la cómoda «voluptuosidad de la queja», ya desenmascarada años atrás por el salmantino **Rector Unamuno,** el Decano Doctor Santos, por un lado daba ejemplo de lo que se podía hacer (dentro de las limitaciones de entonces) y él hacía en su Cátedra; y, por otro, asignaba a dichos compañeros fondos con destino a tales actividades, logrados por él no sin dificultad.

Análogamente, su generosidad llegaba a ceder plazas de Adjunto o de Ayudante a Cátedras cuyas necesidades eran a veces inferiores a las de Bioquímica, en las correspondientes distribuciones.

De la instalación de un comedor para estudiantes y otro, más reducido, para profesores, así como un gimnasio —en el que el joven Decano hacía algún ejercicio que causaba sorpresa y admiración entre los alumnos—, y la ampliación del Museo de la Facultad de Farmacia, nuestros colegas Académicos **Doctores Pedro Malo** y **M.ª Carmen Francés** pueden hablar con mayor detalle, pues ellos y otros compañeros tengo entendido que participaron en tales realizaciones.

Asimismo, en relación con esta etapa decanal de Don Ángel, conviene destacar que gracias a su habilidad diplomática y su prestigio se

evitaron conflictos estudiantiles de origen político que apuntaban en otros centros y se acentuaron a partir de la primavera de 1956.

IV

Al igual que su maestro **Gregorio Marañón** —que se autodenominaba «trapero del tiempo» (6), o sea, quien aprovechaba para trabajar hasta los más pequeños ratos habitualmente desperdiciados por la generalidad de las personas—, Don Ángel logró durante largos años hacerse un amplio hueco en su tiempo disponible para desplegar también una asidua *actividad al frente de un acreditado laboratorio de especialidades farmacéuticas*, que abordó con éxito la fabricación de productos destinados a la alimentación infantil, hasta entonces procedentes casi únicamente de laboratorios extranjeros; todo ello compatible con el desarrollo allí de otras interesantes líneas de investigación aplicada. Por otro lado, al leer los interesantes artículos de la artística revista publicada por dicho laboratorio era fácil detectar la huella del autor o inspirador de los mismos.

También, gracias a él, algunos doctorandos o Doctores de aquel o de otros Departamentos universitarios de Bioquímica encontraron bien retribuida y segura colocación en dicho laboratorio.

V

Y antes de terminar, resulta indispensable recordar, aunque sea con la máxima brevedad, la actividad de Don Ángel como *pensador preocupado por problemas éticos vinculados a los temas científicos*.

Él abordó cumplidamente esta delicada cuestión en su obra cuyo título es bien expresivo: «Vida y espíritu ante la ciencia de hoy». Allí dice: «Lo bioquímico no es una faceta secundaria de la ciencia sino una de sus principales líneas de avance, especialmente como vía para explicar los fenómenos vitales; lo que plantea, al que tiene inquietudes, preguntas de orden metafísico» (7).

Y en otro de sus libros, más reciente, titulado: «Instrumentación genética», señalaba: «En la Bioética, la investigación científica y la

ética se ensamblan con rigurosidad y eficacia para el buen servicio del hombre y de la sociedad, y con ella se fusionan la ciencia y la conciencia» (8). Añadiendo en otra página: «El cardenal Ratzinger —[actual Papa Benedicto XVI]— ha analizado los motivos, profundos, de todo lo que sucede en el campo de la tecnología contemporánea, incluida la moral» (8).

VI

Excmo. Señor Presidente,

Excmos. Sras. y Señores Académicos,

Señoras y Señores:

De la ingente obra llevada a cabo a lo largo de una dilatada y fructífera vida, sólo he podido aquí esbozar y mal hilvanar algunos aspectos, correspondiendo a otros compañeros comentar otras facetas no menos brillantes del hombre, del investigador y del Académico Doctor Santos Ruiz.

Así como lo accesorio suele desaparecer con el tiempo, lo valioso tiende a permanecer. El evangélico dicho según el cual, «por sus frutos los conoceréis», bien puede ser aplicado a lo logrado por Don Ángel. Muy escuetamente, quizá podría resumirse todo esto en el reconocimiento al Maestro Santos Ruiz como **pionero y artífice de las siguientes realizaciones** de interés excepcional:

a) **La introducción de la enseñanza de la Bioquímica en dos cursos de la licenciatura de Farmacia,** temprana medida adoptada por él en 1944 y luego seguida por otras carreras.

b) **La dirección de numerosas Tesis Doctorales,** efectuadas como consecuencia del hecho precedente, que convirtieron la hasta entonces Bioquímica española, sólo teórica, en experimental.

c) **La vinculación internacional de esta disciplina** mediante la participación de Profesor Santos en congresos, y la organización de éstos, representando a España en los organismos nacionales e internacionales correspondientes.

d) **El favorecimiento de la expansión** de la investigación bioquímica **a centros extra-universitarios** (CSIC, etc.).

VII

Por todo ello, resulta lógico y normal que, desde tiempo atrás, Don Ángel Santos Ruiz recibiera muy merecidas y numerosas distinciones nacionales y extranjeras. La simple indicación de las mismas ocupa toda la página reservada a su biografía en el Anuario de 2003 correspondiente a esta Real Academia (9).

Por la conexión con ella, merecen ser destacados los cuatro Doctorados *honoris causa* que recibió:

— Por la Universidad de la Sorbona, a propuesta del ya mencionado Profesor J. E. Courtois (que, en su día perteneció también a nuestra Academia).

— Por la de Cantabria, a propuesta de su paisano, brillante discípulo y Académico, **Profesor José Miguel Ortiz Melón,** que fue Rector de la misma.

— Por la de Alcalá de Henares, rodeado de discípulos, ex-alumnos o compañeros, todos ellos Académicos, como los **Profesores José Luque, Vicente Vilas y Manuel Ortega,** pertenecientes a dicha Universidad.

— Y por la de Navarra, en que los **Académicos Jesús Larralde, Antonio Monge, Esteban Santiago,** etc., han mantenido estrecha relación con Don Ángel.

Asimismo, tal vez la última distinción que recibió, la Medalla Carracido (en su categoría de oro), cuya obtención tan inteligentemente tramitó nuestro **Presidente Juan Manuel Reol,** cabe pensar que ha debido de constituir para el Académico Doctor Santos una de las más íntimas satisfacciones, dado su cariño a esta institución.

VIII

Antes de concluir, ruego me permitan indicar que a sus hasta ahora mencionadas cualidades —*inteligente* en grado sumo, *trabajador* incansable, *generoso* con sus compañeros y colaboradores, *religioso y respetuoso* con las ideas ajenas (como mínimo)— deban añadirse, aunque sea brevemente, dos más: la de su rectitud de conducta y su sentido del humor.

Su *honradez* le condujo a «fidelidades que en ocasiones no son rentables» (3), como él acertadamente expresó, llevando a la práctica la frase de su admirado A. Maurois, según la cual, «la vida es demasiado corta para que pueda ser mezquina» (3).

Su *sentido del humor*, no siempre conocido por algunas personas, aunque sí por los más allegados, lo mantuvo hasta el momento de entrar finalmente en el quirófano, según me dijo su hija **Mari-Carmen** hace poco tiempo.

IX

Gracias a su excelente salud (cuidada con ejercicios físicos y dieta austera), Don Ángel ha llegado hasta nuestros días trabajando en la redacción de libros, y manteniendo actividades como la de impartición de clases y la asidua asistencia a las sesiones de esta Real Academia, constituyendo la jubilación una fase vital que para él ha debido de ser «como el rizado borde de una ola que se apaga lentamente sorbida por la arena de la playa» (3), según exponía poéticamente en 1991, al mismo tiempo que daba gracias a Dios por habérselo concedido (3).

¡Afortunado él, que además se ha visto rodeado siempre por el cariño de una familia ejemplar!

Y, aglutinando a todos, sigue **Doña María del Carmen,** quien en su entorno tiene numerosos descendientes, todos ellos muy unidos, como me decía **Anselmo,** el esposo de Mari-Carmen, en Béjar. **Mari-Carmen, Eduardo, M.ª Rosario** y **Miguel Ángel,** con sus cónyuges respectivos (en equilibrio profesional entre farmacéuticos y economistas-juristas-empresarios), con sus hijos y los hijos de éstos (bisnietos de Don Ángel) forman este asombroso conjunto.

La profunda religiosidad de todos ellos, siguiendo el ejemplo de la que atesoraba nuestro admirado maestro y amigo, les hará asumir, a pesar del dolor por tan irreemplazable pérdida, que (según expresó Dámaso Alonso) (3): «La muerte no tiene pasos cautelosos, ni guadaña. La muerte es la Luz».

Muchas gracias por su atención.

REFERENCIAS

(1) SANTOS RUIZ, A. (2005): *Palabras de agradecimiento con motivo de habérsele concedido la Medalla Carracido (categoría de Oro) por la Real Academia Nacional de Farmacia.*
(2) SANTOS RUIZ, A. (1994): *Sesión necrológica en homenaje al Profesor Alfredo Carrato Ibáñez,* Real Academia de Farmacia.
(3) SANTOS RUIZ, A. (1991): *Retrospectiva bioquímica:* Facultad de Farmacia de Madrid, 1886-1986. Discurso para la recepción como Académico de la Real Academia Nacional de Medicina y contestación por el Excmo. Señor Don Domingo Espinós, pp. 41, 20, 44, 70, 104 y 8.
(4) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1976): *Tesis Doctorales,* Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica, pp. 6 y 5.
(5) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1982): Actos celebrados en al Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en Homenaje al Profesor Doctor Ángel Santos Ruiz con motivo de su jubilación. *Anal. Real Acad. Farm.* 48, 355-364.
(6) SANTOS RUIZ, A. (1987): Investidura de Doctor *Honoris causa* por la Universidad de Alcalá de Henares (16-XI-1987) del Profesor Á. Santos Ruiz. *Anal. Real Acad. Farm.* 53, 697-703.
(7) SANTOS RUIZ, A. (1970): *Vida y espíritu ante la ciencia de hoy*. Rialp, Madrid, p. 12.
(8) SANTOS RUIZ, A. (1987): *Instrumentación genética,* Libros mc, Madrid, pp. 6 y 259.
(9) INSTITUTO DE ESPAÑA: Real Academia Nacional de Farmacia. Anuario 2003, p. 144.

Otros datos biográficos relativos al Profesor A. Santos Ruiz pueden hallarse en las publicaciones siguientes:

— SANTOS-RUIZ DÍAZ, M. C. (1982): *Datos para la historia de la Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid. Tesis Doctoral* (Fac. Farmacia, Univ. Complutense).

— VARIOS AUTORES (1982): «Ángel Santos Ruiz: Breve reseña académica». *Rev. Esp. Fisiol.* 39 (suplemento), VIII-XXIII.
— MIRAS PORTUGAL, M. T. (2000): Ángel Santos Ruiz recibe la medalla de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). *Boletín de la SEBBM* 128, p. 21.
— PALACIOS ALAIZ, E. (2000): Real Academia de Doctores.
— CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (2005): *Santos Ruiz, Ángel. Diccionario Biográfico Español* (Real Academia de la Historia) (en prensa).
— CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (2005): «El Profesor Don Ángel Santos Ruiz», *Boletín de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)*, 144, pp. 42-44.

Don Ángel: científico e investigador

FEDERICO MAYOR ZARAGOZA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

«Cuando bebas agua, piensa en la fuente»
Proverbio

Así comencé las palabras con las que, el 27 de mayo de 1982, contribuí al homenaje que se rendía a Don Ángel Santos Ruiz con motivo de su jubilación, al cumplir los setenta años. Le quedaban, por fortuna, muchos años de magisterio, de orientación adecuada, por la inmensa experiencia y conocimientos acumulados en la búsqueda de respuestas sobre la fisiopatología humana, con el afán de contribuir al bienestar, a la calidad de vida, a prevenir o paliar el sufrimiento humano. Tenaz, incansable, imaginativo en cómo desvelar, des-cubrir las bases de la vida y su funcionamiento. Los factores que lo favorecen o dificultan. Y las mejores o más nocivas condiciones de su entorno. Noventa y un años de mirada, serena e inquietante a la vez, sobre el misterio radical de la existencia, de la vida, de cada vida.

Aquí, señor Presidente, en el recinto de esta Real Corporación, antes Facultad de Farmacia, vivió el Profesor Santos Ruiz distintas etapas de su vida, fuente y semilla. Fuente de conocimiento, que hoy recordamos con profundo reconocimiento. No en vano era natural de Fontibre. Y semilla: hasta el último día, lo digo emocionado, sembrador, esparciendo su saber a manos llenas.

Aquí, aquí mismo en este espacio donde Don Ángel expuso tantas veces sus proyectos y los resultados de sus trabajos.

Aquí, en la Real Academia Nacional de Farmacia, cuyos designios dirigió el Profesor Santos Ruiz durante tantos años con tanto acierto.

Aquí, donde tantos discípulos de más de tres generaciones han honrado a su maestro.

Aquí, donde hoy nos acompañan representantes tan notorios de su escuela: José Antonio Cabezas, Manuel Ruiz Amil, Julio Rodríguez Villanueva, María Cascales, Bartolomé Ribas, María Teresa Míras Portugal, etc., etc.

Y otros muchos que, sin hallarse físicamente entre nosotros, están presentes en este espacio espiritual en el que un día comunicaron sus investigaciones e hipótesis: Miguel Comenge, Carmen del Amo, Avelino Pérez Jeijo, José Lucas Gallego, Ana M.ª Galarza, Dolores Stamm Menéndez, José Luis Fontán Candela, Manuel Sanz Muñoz, etc...

Todos ellos están, a todos ellos tenemos presente en este acto en el que, debido a su muerte, celebramos la vida fructífera, inspiradora, intensa, del Profesor Santos Ruiz.

Sus discípulos siguen los derroteros trazados por la gran figura académica, científica y, sobre todo, humana que hoy evocamos en Facultades de Farmacia, de Medicina, de Ciencias Químicas, de Ciencias Biológicas, en Facultades de Veterinaria, en industrias químico-farmacéuticas y biotecnológicas... de su maestro.

Se inició en la investigación en 1932, en el Instituto de Patología Médica que dirigía el Profesor Gregorio Marañón, simultaneándola con la docencia como ayudante de clases prácticas en la Facultad de Farmacia de Madrid. Antes de ocupar, por oposición, la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Farmacia de Madrid en 1940, su formación científica y docente se había completado en el departamento de Bioquímica en la Universidad de Londres, donde trabajó bajo la dirección de Sir Jack Drummond (1934-1935) y en las Facultades de Medicina y Farmacia de París con los Profesores Giroud y Fabre (1935-1936).

La labor investigadora del Departamento de Bioquímica en los primeros años se refiere preferentemente a trabajos de bioquímica analítica, denominada también «bioquímica estática». Estamos en la era de la «química biológica». Su primer trabajo se publicó en los anales de la Sociedad Española de Física y Química (*31*, 458) en 1933, sobre «Metódica para la determinación del ácido láctico», en

colaboración con J. A. Collazo. Le sigue un estudio comparativo de métodos para la determinación de colesterina. Y luego, determina varias vitaminas en materiales biológicos. En 1936 cuenta ya con casi veinte publicaciones científicas. Se reanudan después de la Guerra Civil, en septiembre de 1939, con «Capacidad del feto para sintetizar ácido ascórbico», con el Profesor Giroud y, un año más tarde, con J. Jiménez Vargas, sobre anafilaxia y vitamina C.

En 1943 aparece su primer estudio sobre el glutation, sustancia a la que dedicará una particular atención. Antes de proseguir esta revisión cronológica quisiera, aún conociendo de forma muy directa la interconexión que existe entre ellas, establecer las siguientes áreas en las que pueden incluirse la mayor parte de la actividad científica del Profesor Santos Ruiz:

1. Bioquímica del glutation.
2. Oligoelementos.
3. Composición química de materiales de procedencia vegetal y bioquímica de la germinación de semillas.
4. Estudio bioquímico de algunos insectos (en particular *Bombyx mori)*.
5. Enzimas descarboxilantes.
6. Bioquímica de Zinc^{65} (Zn^{65}).
7. Bioquímica de las hepatopatías experimentales.

A estos grandes campos hay que añadir la *crio-conservación*, cuyos estudios se iniciaron en 1957 con José Moreno Calvo y, a los que, más adelante, se incorporaron los hermanos Luis y José Antonio Muñoz-Delgado Ortiz.

Fue también en los laboratorios del Profesor Santos Ruiz donde, en colaboración con José Antonio Cabezas Fernández del Campo, se iniciaron las *investigaciones sobre mucoides* (mucoproteínas) cuyos estudios se proseguirían después por parte del Profesor Cabezas hasta constituir uno de los capítulos —glicoproteínas en sueros de mamíferos, de humanos, en orina, calostro..., ácidos siálicos y neuramínicos...— más completos de las aportaciones a tan importan-

tes compuestos biológicos realizadas por un centro español de Bioquímica.

Asimismo, con María Cascales y Pilar González, en particular, se estudió el *metabolismo monopeptídico en tejidos vegetales cultivados in vitro*. Por último, deben mencionarse las determinaciones de *esteroides urinarios*, que realizó con el Profesor José Botella Llusiá, en la segunda mitad de los años cincuenta, dando lugar a varias publicaciones.

Como antes he indicado, voy ahora a sobrevolar las contribuciones realizadas en las siete áreas principales de la labor investigadora desarrollada y dirigida por Don Ángel Santos Ruiz.

1. Glutation

El primer trabajo es el «Estudio sobre la cuantitativa de glutation en material biológico», realizado en 1943 con M. Rotllant De Franch. En 1945 publica con J. Lucas Gallego y A. Brieva Andrade, «Metabolismo del glutation en el cáncer». Siempre con la colaboración de J. Lucas Gallego, se realizan varios trabajos sobre la fisiopatología del glutation, en particular en procesos inflamatorios y degenerativos (años 1953 a 1956). Es en 1957 cuando inicia, con José Antonio Cabezas, los trabajos con seromucoides adicionados de glutation.

2. Oligoelementos

Desde 1944, con Miguel Comenge Gerpe y con J. M. López Azcona, abre un nuevo capítulo en el que su escuela es pionera en España, determinando oligoelementos en asociaciones vegetales. Desde 1946 con Miguel Guelbenzu, realiza trabajos muy numerosos sobre la composición en elementos traza de material de distintas procedencias, muy especialmente en semillas. En 1948 se une A. Sampedro Piñeiro a buena parte de las investigaciones, concentrándose en alimentos de origen animal. En 1952 aparecen cuatro publicaciones, todas ellas con Dean y López Azcona, sobre oligoelementos en tejidos normales y patológicos. Por último, en 1958, Don Ángel publica en los Anales de la Real Academia de Farmacia un importante tra-

bajo sobre «El fenómeno de la quelación en la bioquímica de los elementos traza».

3. Composición química de materiales de procedencia vegetal y bioquímica de la germinación de semillas

Como ya he anticipado, el estudio de las semillas en distintas condiciones (estratificación, germinación, etc.) ha constituido una de las líneas que caracterizaron durante varios años las actividades del Departamento mixto que dirigía el Profesor Santos Ruiz. Ya en 1944, con J. A. Merino y J. Portús Serrano, estudia la composición de diversas semillas, trabajos a los que se incorpora en 1945 quien iba a dedicar buena parte de sus muchos años de investigación científica a este tema: Manuel Sanz Muñoz. En 1948, con V. Villar Palasí y P. Andrés Irigoyen, estudia los aminoácidos del grupo de la leucina en la semilla de *Lathyrus sativus*. Unos años más tarde, con Pilar González y María Cascales, los estudios analíticos se convierten, principalmente, en cambios observados durante la germinación. Así, en 1970, aparece en la Revista Española de Fisiología el trabajo «Cambios en el contenido de aminoácidos libres y otras fracciones nitrogenadas durante el proceso de germinación de las semillas de *Lupinus albus*». En los años 1973, 1975 y 1976 aparecen los resultados de las investigaciones realizadas sobre los cambios bioquímicos que tienen lugar en las semillas de *Pinus pinea*. En estos trabajos intervienen Ángel Giménez Solves y C. J. Martínez Honduvilla.

4. Estudio bioquímico de algunos insectos (en particular *Bombyx mori)*

María Dolores Stamm Menéndez fue la gran protagonista de las complejas y pacientes investigaciones sobre la bioquímica de los insectos y, en particular, del *Bombix Mori L.* En 1950 aparecen los dos primeros trabajos relativos a esta línea: metabolismo de la tiroxina, triptófano y fenilalanina en el gusano de la seda. Miguel Comenge figura como colaborador en ambas publicaciones.

5. Enzimas descarboxilantes

El «Warburg» era, en buena medida, el símbolo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia. No era fácil en aquellos momentos —en que poníamos a prueba la calidad de los colorímetros Klett-Summerson— disponer de una metodología tan precisa para el estudio de los intercambios gaseosos. El anhídrido carbónico constituye, sin duda, junto con el agua, uno de los productos clave de los fenómenos oxidativos para la extracción de energía. Del mismo modo que H_2O constituye la forma más oxidada del hidrógeno, el CO_2 lo es del carbono. Término de un proceso, principio, en los seres autrótofos, de los fenómenos de reducción que conducen a los «combustibles» biológicos. La investigación acerca de los enzimas descarboxilantes se inicia en 1955 con Gertrudis de la Fuente y R. Díaz Cadavieco, con el «Estudio sobre la descarboxilasa tirosínica». Luego, en 1956, con la incorporación de David Martín Hernández, aparece el «Estudio sobre descarboxilasas, VIII», que constituye una de las más destacadas aportaciones en esta línea de investigación. En este mismo año, me incorporé, con M.ª Luisa Begué Cantón, a esta línea de trabajo, investigando la descarboxilación del ácido glutámico. El ácido 4-aminobutírico se convierte, debido al ciclo vicario al de los ácidos tricaborxilicos o de Krebs que protagoniza, en uno de los temas de referencia de la escuela del Profesor Santos Ruiz, en atención, sobre todo, al importante papel que desempeñan el ácido glutámico, el 4-aminobutírico y sus derivados en el metabolismo cerebral.

En 1962 Don Ángel publica en el Bulletin de la Société de Chimie Biologique, de Paris, un trabajo sobre la descarboxilación enzimática en los seres vivos. No es sólo una compendio de lo realizado hasta aquel momento en su grupo —pronto aparecería la publicación núm. 18 de esta línea— sino, en particular, una proyección de la importancia del fenómeno de la descarboxilación en los diseños fisiopátologicos del futuro. El mismo año se incorpora María Cascales en dos publicaciones sobre la glutamato descarboxilasa de *Lupinus albus*. Un año más tarde, en tejidos de *Helianthus tuberosus* cultivados *in vitro*. En 1964 aparece la publicación sobre el metabolismo del 4-aminobutirato 1-C14 en estos tejidos. Con la incorporación de J. M. Ortiz, María Cascales y el Profesor Santos Ruiz

publican en los años 1970 a 1975 interesantes trabajos sobre la glutomato descarboxilasa, el 4-aminobutírico y su coenzima, el piridoxal-5-fosfato.

6. Bioquímica del Zinc^{65} (Zn^{65})

Carmen García del Amo, Ana María Galarza y Bartolomé Ribas Ozonas son los principales colaboradores del Profesor Santos Ruiz en esta línea de investigación. El primer trabajo aparece en 1951: «Estudios metabólicos con el Zinc-65. I. Datos preliminares sobre su absorción y eliminación en conejos inyectados por vía intraperitoneal». En 1963 aparece la quinta publicación de esta serie, que se refiere a las alteraciones hematológicas producidas en la sangre de perros inoculados con Zinc-65. En los trabajos numerados VII, VIII y IX, Ana Chueca y E. Iranzo se unen a este grupo de investigación al que, más tarde, Bartolomé Ribas Ozonas incorporará sus estudios sobre la bioquímica del cadmio.

7. Bioquímica de las hepatopatías experimentales

Ha constituido el gran «tema preferente» de los últimos años de la escuela del Profesor Santos Ruiz. María Cascales ha sido el hilo conductor de los distintos colaboradores del Profesor Santos Ruiz en estas investigaciones. Cuando se administra tioacetamida, el ciclo de la urea hepático resulta inhibido en tres de sus enzimas: carbamilfosfatosintetasa, ornitina transcabamilasa y arginasa, con el consiguiente incremento del amonio hepático. Los enzimas clave de la glucolisis aparecen frenados por el efecto de la tioacetamida, mientras se incrementan las dos deshidrogenas del ciclo de los pentosafosfato. Los estados redox citosólicos y mitocondrial NADP-dependientes aparecen alterados y con ellos la actividad mitocondrial.

En 1978 se publica el primer trabajo sobre el efecto hepatotóxico de la tioacetamida sobre los enzimas dependientes de NADP, aminotrasferasas y glutamato deshidrogenasa. Un año más tarde, se estudia el efecto de la tioacetamida sobre los enzimas del ciclo de la urea en hígado de rata. En 1982, entre otros, se estudian los cambios del

metabolismo lipídico en la cirrosis inducida y la repercusión metabólica del coenzima-A en las hepatopatías inducidas por etanol. En este mismo año —en el que aparecen cinco trabajos publicados sobre este tema— se analiza la activación de la anginasa y la incorporación de 32-P en los fosfolípidos hepáticos. En 1983 y 1985 se sigue ampliando el ámbito de tan relevante línea experimental por sus implicaciones patológicas.

* * *

Acabamos de sobrevolar los grandes temas de investigación que promovió el Profesor Santos Ruiz, incluyendo, sin pretender ser exhaustivo, a sus más distinguidos acompañantes en esta importante faceta de su vida. A las líneas mencionadas deberíamos añadir aquellas que cada uno de sus discípulos, en sus nuevos destinos —Salamanca, Sevilla, Granada, Barcelona, Santiago de Compostela...— fueron desarrollando a través de los años. Esta gran riqueza originada por «la fuente Santos Ruiz» se refleja de manera muy adecuada en el libro-suplemento de la Revista Española de Fisiología que fue dedicado al Profesor Santos Ruiz con motivo de su jubilación.

En efecto, en este volumen pueden hallarse con detalle las publicaciones del Profesor Santos Ruiz hasta el año 1981 y una interesantísima publicación sobre «Topografía del ciclo metabólico del 4-aminobutirato». El Profesor José Antonio Cabezas Fernández del Campo publica: «Ácido siálico», una breve revisión sobre los resultados obtenidos en esta línea de trabajo en los últimos veinticinco años, y varias investigaciones sobre gangliósidos. Y, como antes indicaba, figuran a continuación trabajos de varios discípulos de tres «generaciones». Con Fernando Valdivieso, Cecilio Jiménez, Jesús Benavides y M.ª del Carmen Aragón contribuí a este número con «Patogénesis de la disfunción cerebral en la fenilcetonuria». Magdalena Ugarte, José María Medina, Margarita Lorenzo, Manuel Benito de las Heras, Fermín Sánchez de Medina, Federico Mayor Menéndez —con «Efecto de la anoxia neonatal sobre los niveles de bilirrubina en cerebro de ratas»—, Carlos Alonso Bedate...

* * *

En su conferencia inaugural de las «Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas», en junio de 1996, Don Ángel citó a San Agustín: «Busquemos como buscan los que aún no han encontrado, y encontremos como encuentran los que aún no han buscado». En ambos casos tenemos que estar atentos, para observar, para darnos cuenta. Es una actitud. Un comportamiento «científico», que en tan alto grado y tan pluridimensional caracterizó a Don Ángel. Refiriéndose a él, decía el Profesor Ochoa en 1975 —en su septuagésimo aniversario— que «había desempeñado un importantísimo cometido en el mantenimiento y engrandecimiento de la llama de la bioquímica española», en circunstancias nacionales e internacionales particularmente adversas.

El conocimiento es la base del progreso, de la calidad de vida, de la economía. Y del acto más profundamente humano: la prevención. Saber para prever, prever para prevenir. Don Ángel Santos Ruiz, farmacéutico y médico, sabía muy bien que no podemos prevenir sin conocer. Que no podemos mitigar sin, al menos, vislumbrar.

No se llama «maestro» al gran científico ni al excelente expositor. Se llama maestro a quien posee, a los ojos de sus discípulos, la autoridad moral, a quien no sólo orienta nuestras investigaciones científicas sino nuestras propias reflexiones.

Observar... y pensar. Es muy difícil, ha escrito Julián Marías, observar lo que vemos continuamente. Y —cito ahora al Profesor Hans Krebs—: «investigar es ver lo que otros también ven y pensar lo que nadie ha pensado». Observar y reflexionar.

Nunca olvidaré la intensa emoción que me produjo, a la llegada de unos autobuses escolares al Mar de Plata, en Uruguay, oír que una de las niñas, al ver por primera vez el mar, exclamaba tirando de la mano de su maestra: «¡Ayúdeme a mirar!» Don Ángel nos ayudó a mirar. A observar y a pensar. Su obra científica permanece, con su estela humana, para seguir iluminando muchos caminos de futuro.

Ángel Santos Ruiz Académico

MARÍA CASCALES ANGOSTO
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Señor Presidente, Académicas y Académicos, Queridísima María del Carmen, hijos y nietos Santos-Ruiz, Señoras y Señores.

En la vida de Don Ángel, las Academias han ocupado un lugar preferente. Ángel Santos Ruiz ha sido Académico de Número de las siguientes Reales Academias:

De la Nacional de Farmacia durante sesenta y cuatro años.

De la Real de Doctores durante treinta y cinco años.

Y de la Nacional de Medicina durante catorce años.

Ingresó en la Real Academia Nacional de Farmacia (medalla 27) el 16 de junio de 1941 con el discurso titulado «Bioquímica de factores cancerígenos», que fue contestado por el Académico de Número César González Gómez (fue la vacante de Don César la que pasados los años yo tuve el honor de ocupar).

Ingresó en la Real Academia de Doctores el 11 de diciembre de 1970 (medalla 106) con el discurso: «Repercusión terapéutica de la movilización enzimática del anhídrido carbónico», que fue contestado por el Académico de Número Juan Abelló Pascual. En la Academia de Doctores ha sido Presidente de la Sección de Farmacia, Presidente de Honor de la misma Sección, Académico de Honor y Medalla de Oro al Mérito Doctoral.

Ingresó en la Real Academia Nacional de Medicina (medalla 13) el 29 de octubre de 1991 con el Discurso: «Retrospectiva bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid 1886-1986», que fue contestado por el Académico de Número Domingo Espinós Pérez.

En nuestra Academia ha ocupado los cargos de Vicedirector durante ocho años (1968-1976), Director durante quince años (1976-1991), y de Director-Presidente de Honor desde 1992 hasta su muerte. Recientemente obtuvo la Medalla de Oro Carracido, por unanimidad.

Durante su mandato como Director y teniendo a Manuel Ortega Mata como Secretario Académico, se realizaron obras muy importantes de acondicionamiento del edificio. Entre otras, se consiguió recuperar para la Academia los locales que ocupó el Instituto Nacional de Toxicología; se inauguró el aula de la planta baja; se introdujeron los primeros ordenadores en nuestra Academia y se inauguró la denominada por él «Sala de recuerdos», que llevó personalmente en sus inicios con Sagrario Muñoz Calvo y en la actualidad, gracias al empeño puesto en esta empresa por Carmen Francés, ha llegado a alcanzar la categoría de ser reconocido como museo.

También durante su mandato se iniciaron cursos monográficos del doctorado en colaboración con la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. En el primero de estos cursos, sobre «Disfunciones hepáticas», tuve el honor de ser la responsable con Francisco Ferrándiz contando con personalidades de gran categoría: Santiago Grisolía, Alberto Sols, Francisco Grande Covián, Sergio Erill, los hermanos Nájera Morrondo, etc. Las conferencias de este curso se publicaron, financiando su publicación el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Don Ángel realizó un Prologo-Introducción enormemente documentado. Este curso y otros más fueron una experiencia previa a los que hoy organiza el Instituto de España.

Don Ángel fomentó de manera muy especial las relaciones con el extranjero. Por eso, durante el período dirigido por él, fueron numerosas las personalidades de prestigio que visitaron nuestra Academia y fueron condecoradas con nuestra Medalla. Entre estas personalidades cabe destacar el Premio Nobel George Emil Palade, de los Estados Unidos; David Brindley, Profesor de la Universidad de Nottingham, del Reino Unido; David Waxman, Rector de la Universidad de Kansas, en Kansas City, etc. Otras personalidades ingresaron en nuestra Academia, entre ellas cabe destacar a Santiago Grisolía, maestro también de bioquímicos, con el que más de uno de los académicos de esta Academia realizamos nuestra estancia post-doctoral en los Estados Unidos.

Es un hecho conocido que la colaboración científica entre Don Ángel y yo se extiende desde los tiempos de mi Tesis Doctoral dirigida por Federico Mayor. Esta colaboración ha continuado durante casi cincuenta años. Entre los últimos artículos que publicamos Don Ángel y yo, se puede citar el aparecido en los Anales de la Real Academia de Medicina. Trataba de telómeros y telomerasa. Otro sobre Restricción calórica fue recogido en la Monografía de nuestra Academia, sobre Alimentos coordinada por Bernabé Sanz.

Otra colaboración entre Don Ángel y yo han sido los cursos del Tercer Ciclo del Instituto de España, que se inauguraron en 1989. El último fue el del presente año, sobre Bases Moleculares del Estrés Oxidativo en el que intervenían también Bartolomé Ribas Ozonas y Ángel Villar del Fresno. El curso finalizó en los primeros días del pasado mes de abril.

Entre otras actividades académicas Don Ángel realizó numerosos discursos de contestación a los ingresos de los Académicos Numerarios, con la pulcritud y sabiduría que él ponía en todo lo que hacía. Hay que destacar los correspondientes a sus discípulos más directos: en 1976 contestó al ingreso de Federico Mayor Zaragoza, en 1987 al ingreso de la que les habla, en 1990 a José Antonio Cabezas y en 2001 a María Teresa Miras Portugal.

En esta Academia la mayor parte de los Académicos Bioquímicos son, en mayor o menor grado, discípulos de Don Ángel: Bartolomé Ribas, Manuel Ruiz Amil, Miguel Deán Guelbenzu, José Antonio Muñoz Delgado, Francisco Ferrándiz, José Miguel Ortiz Melón, Evangelina Palacios Aláiz, José Luque Cabrera, Manuel López Pérez, Miguel Ángel Santos-Ruiz, etc. De segunda generación: Magdalena Ugarte, José María Medina, Ángel Reglero, etc. De tercera generación: Manuel Benito, Margarita Lorenzo, etc. Otros Académicos discípulos de Don Ángel nos dejaron y a ellos quiero ahora dedicarles un recuerdo: Carmen García Amo, Manuel Sanz Muñoz, Dolores Stamm Menéndez y Ana María Galarza Basanta.

La importancia que Don Ángel daba a las Academias a las que pertenecía se hacía manifiesta en su asiduidad. En nuestra Real Academia esta asiduidad ha sido espectacular. Desde 1941, año en el que ingresó, él dedicó todos los jueves de su vida a las tareas académicas. Para él la Academia era algo muy importante. En el Anuario

2004 se recogen 2.136 asistencias que, unidas a las 14 del presente año, dan un total de 2.150. Ningún Académico ha logrado nunca tal cantidad de asistencias.

En fechas relativamente recientes, en esta misma sala se le han dedicado dos calurosos homenajes: Uno de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular y el otro dedicado por la Academia en conmemoración a sus noventa años.

En el homenaje, organizado por María Teresa Miras y Juan Guinovart, la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular le ofrecía la Medalla de Oro de Socio de Honor, por su participación en la creación de la Sociedad Española de Bioquímica y por su ejemplar y dilatada labor docente de la Bioquímica en España.

Más adelante, con motivo de su noventa cumpleaños, nos reunimos otra vez los Académicos para rendir homenaje a este hombre bueno y sabio. Celebramos entonces sus noventa fructíferos años, llenos de salud, ponderación y armonía.

Más recientemente dos acontecimientos importantes tuvieron a Don Ángel como protagonista de excepción. El primero fue el Acto de homenaje de jubilación a Federico Mayor Zaragoza, en la Universidad Autónoma de Madrid, en septiembre del año pasado, para el que Don Ángel escribió unas bellísimas palabras dedicadas a Federico, como él sólo sabía hacerlo, que yo tuve el honor de leer. El segundo fue el de la imposición a él de la Medalla Carracido en su categoría de Oro, máximo galardón de la Real Academia Nacional de Farmacia, en la apertura de curso del pasado mes enero bajo la Presidencia de la Ministra de Educación, María Jesús Sansegundo. Para este acto, también Don Ángel escribió unas hermosas palabras de agradecimiento que fueron leídas por José Antonio Cabezas.

El 14 de abril de este mismo año, Don Ángel asistió a la Academia como era su costumbre, ocupando un lugar en la presidencia como Presidente Honorario. Ese día se celebraba la toma de posesión de Académico Correspondiente del Profesor José Enrique O'Connor Blasco, de la Universidad de Valencia. El 16 de abril, dos días después sufrió una caída con fractura de cadera. El Presidente Juan Manuel Reol y yo fuimos a verle a la Clínica de la Moncloa. Muchos otros académicos también lo visitaron. El 23 de abril a las

8 de la mañana falleció. Era sábado, Miguel Ángel, su hijo, me llamó minutos después para comunicarme la triste noticia. Nueve días antes de su muerte asistió a la Academia por última vez.

No es necesario decir descanse en paz, porque Don Ángel en vida había conseguido estar en paz con todos, por su grandeza de espíritu, por su vida ejemplar e intachable y por su carácter bondadoso, no exento de energía, siempre dispuesto al diálogo.

Voy a exponerles unas fotografías de Don Ángel, de las muchas que poseo de algunos actos académicos a los que me he referido y algunas otras de carácter familiar y festivo, que dan buena cuenta de nuestro Don Ángel como académico y como ser humano y de su carácter afable y optimista.

Señoras y señores, querida familia Santos Ruiz, amigas y amigos.

Hace ya seis meses que don Ángel se nos fue. A la tristeza angustiosa de los momentos inmediatos a su muerte, ha seguido el dolor resignado de su ausencia. Vienen a mi memoria palabras de Juan Manuel Reol en un escrito dedicado a Don Ángel: «Hemos perdido a un hombre bueno, a un hombre irreemplazable, pero hemos de dar gracias a Dios por habernos permitido contarnos entre sus amigos».

Yo tengo que decirles, y muchos de ustedes ya lo saben que Don Ángel era para mí más que un maestro o un amigo, era un ser entrañable. Este verano su esposa María del Carmen tuvo la atención de invitarme a pasar un fin de semana en su residencia de Béjar, lugar donde siempre ha pasado los meses de verano toda la familia. Me consideré enormemente afortunada de poder compartir con ella y los suyos unos momentos inolvidables. Visitamos el panteón donde descansan los restos de Don Ángel, rezamos en la iglesia del Castañar, situada en lo alto de una colina rodeada de castaños y disfrutamos de los paisajes maravillosos de aquella zona. En su casa de Sánchez de Ocaña, 62, observé una fotografía. En ella, fechada el 17 de junio de 2004, dos días antes de cumplir sus noventa y dos años, aparecen Don Ángel y su esposa rodeados de sus hijos, nietos y trece biznietos. En la fotografía de este año con quince biznietos y dos que vienen de camino, Don Ángel ya no está. Este verano hubiera cumplido noventa y tres años.

Su recuerdo perdurará siempre en nosotros, en los que le queríamos, su esposa y compañera durante más de sesenta y dos años, sus hijos, nietos y biznietos, sus discípulos, sus amigos, todos los Académicos de esta Casa y todas aquellas personas que le conocieron. He dicho.

Don Ángel: maestro y amigo

BARTOLOMÉ RIBAS OZONAS
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente, Excmas. y Excmos. Señoras y Señores Académicos, Doña Carmen, Mamen, Eduardo, Mari Chari y Miguel Ángel, nietos y biznietos, Señoras y Señores:

Los grandes hombres que nos han precedido en todas las épocas han dejado el ejemplo de su vida para las generaciones posteriores. Don Ángel ha sido uno de ellos. Era una persona que marcaba a todo aquél con quien se relacionaba.

¿Cómo conocí a Don Ángel? En la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela se comentaba que el Profesor Santos Ruiz formaba una Escuela de Bioquímica en Madrid. Como tenía ilusión de trabajar en ese Departamento, solicité realizar las prácticas de alférez-piloto en el Aeródromo de Torrejón de Ardoz. Una vez en Madrid, fui a visitar su Departamento y me encontré con un grupo de jóvenes entusiastas, que les azuzaban por salir tarde y poder cerrar la Facultad. Allí estaba y me recibió como cabeza de serie, de estelar carrera, nuestro compañero Académico Federico Mayor Zaragoza, quien me presentó a Don Ángel, que asintió y me saludó cordialmente, y a su vez a la fiel colaboradora Carmen García del Amo, la responsable de la Sección de Radiactividad, a Miguel Dean Guelbenzu y Manuel Sanz Muñoz, que aumentaban la masa crítica científica del Instituto de Bioquímica. Los jóvenes brillantes colaboradores que allí trabajaban eran: María Cascales, Francisco Ferrándiz, Ángel Díez Taladrid, Pedro Marcos, Ana María Galarza y Marisa Begué. Precisamente, en nuestro viaje fin de carrera de Santiago, patroneados por los profesores Cadórniga y Vieitez, bien conocidos en esta Real Academia, visitamos el Departamento de Bioquímica de Don Ángel, como el más significativo de una Facultad de Farmacia.

Pronto me llamó la atención que Don Ángel era un hombre que tenía un espíritu universal, pues se interesaba por todos los problemas que importaban a la persona humana y, como científico, se interesaba y buscaba la verdad y la belleza. En el ámbito de la amistad, que me ha correspondido hablar en esta sesión, quienes hemos tenido la suerte de ser sus amigos, los temas preferidos eran, creo resumir bien, la familia, el trabajo y la religión. Me daba a conocer a su familia y se interesaba por la nuestra. Comenzaba preguntándome por mi mujer, mis hijos, mi madre, por el trabajo. Se interesaba por la sociedad, el clima, además de los temas que se acaban de mencionar y de otros, algunos de los cuales les expondré seguidamente como recuerdo. Los avances de la tecnología y el desarrollo; temas de medicina, científicos y literarios, la malnutrición y la necesidad de ayuda a los países subdesarrollados. El significado biológico y toxicológico de los elementos minerales, los oligoelementos, sobre el que ya se disponían publicaciones diversas y que me había confiado para investigar, era uno de los temas en el que Don Ángel tenía especial interés. Esta línea de investigación evolucionó hacia el significado biológico y toxicológico de la metalotioneína, la separación de sus formas moleculares y su significado principalmente como bioindicador de polución ambiental en especies diversas y en los seres humanos.

Don Ángel y Doña Carmen, siempre risueños ambos, nos recibieron en su casa con una profunda hospitalidad y se interesaban por todo lo que podía afectarnos. Nos atendían con amabilidad y cariño, y se vivía en su casa un ambiente de estudio y de trabajo. En el ámbito de lo humano, se palpaba cordialidad y generosidad con sus numerosos discípulos. Muchas gracias, Doña Carmen, por el cariño que nos ha transmitido, y por el que nos hemos sentido acogidos en su casa. Le manifiesto como también a sus hijos Mamen, Eduardo, Mari Chari y Miguel Ángel, que siento profundamente haber perdido en su marido y vuestro padre y abuelo, un admirable maestro, excelente persona y un amigo sin igual.

Don Ángel era un hombre agradecido, y lo practicaba, pues aún después de su muerte, recibí una tarjeta manuscrita desde la clínica, que su hijo Eduardo me hizo llegar. Le oímos decir en uno de sus discursos, hace ya años, que: «ser agradecido es de bien nacido». En lo que a mí respecta, el filósofo von Hildebrand, tío-abuelo de mi

mujer, que tuve la suerte de conocer personalmente, en su libro «Über die Dankbarkeit», 1980 (La gratitud), escribe: «Un hombre que se avergüence de estar agradecido a otro, y sienta esto como dependencia gravosa, es todavía un esclavo de su soberbia. Quien está tan apegado a sí mismo, que da por supuestas todas las cosas buenas que tiene, le falta la verdadera lucidez y libertad, y no ha entrado en el reino de la bondad». El prestigioso científico, Losada Villasante, en su comunicación personal en esta Academia con el título: «Del corazón y la mente» (Publicaciones Singulares de esta Real Academia Nacional de Farmacia, 2005), señaló, que el premio Nobel Severo Ochoa, preciaba más ser recordado como hombre bueno y tolerante que buen científico. En su disertación mantenía que la bondad de corazón y la sabiduría del cerebro eran los dones más importantes de la persona humana.

Como científico, Don Ángel buscaba la verdad y la belleza. Edith Stein escribió: «el que busca la verdad busca a Dios, sea o no consciente de ello». Edith Stein y von Hildebrand fueron discípulos de Husserl y Scheler, ambos convertidos al catolicismo, y mientras la primera sucumbió en el campo de concentración de Auschwitz, y ahora es venerada como Santa Teresa Benedicta de la Cruz; von Hildebrand pudo difícilmente escapar de los nazis en Munich, gracias a conservar su pasaporte suizo, con el que fue obsequiado su abuelo ingeniero por construir los ferrocarriles suizos *(Alma de León*. Biografía de Dietrich von Hildebrand, Ediciones Palabra, Madrid, 2001). Con lo inteligente y ameno que era Don Ángel, recordábamos, a veces de viaje, a von Hildebrand, que visitó Madrid en los años sesenta. El filósofo opinaba que «el gran enemigo del hombre es la indiferencia, porque en la indiferencia todo se reduce; todo da lo mismo, porque todo es lo mismo, ya que en última instancia todo terminará con la muerte». Al filósofo no le dio todo lo mismo, pues escribió y se manifestó contra las ideas hitlerianas en Munich. Para decirnos con ello que si no hay otra vida, carecen de trascendencia para muchos, las vicisitudes que ocurran en ésta.

Don Ángel tenía una amplia y profunda formación científica, además de un alto prestigio en España y en el extranjero, por ello fue invitado a la creación e inauguración de la Fundación Juan March por el mecenas balear, y clarividente financiero Juan March Ordinas. A ese respecto, me relató en una de las Reuniones Interna-

cionales que, Don Juan March se expresó en términos muy comedidos de que las ayudas y los premios de la Fundación serían seleccionadas y distribuidas por los científicos, que son los que saben de ciencia, mientras que la familia proporcionaría lo que entiende, la información y gestión de los medios económicos. Desde entonces, como es bien conocido, la Fundación March está a la cabeza de las actividades científicas y culturales en Europa y en la evolución cultural de la sociedad española del recientemente finalizado siglo XX.

Otro de los temas por los que se interesaba Don Ángel era el clima y la sostenibilidad del planeta. Me decía que algunos científicos creen que el clima se está calentando, pero otros que se está enfriando; y que la temperatura oscila de unos siglos a otros, pues hacia el año 1200 d.C. la temperatura de la Tierra aumentó, y se derritió parte del hielo ártico; y que hacia el 1800 la Tierra sufrió una miniglaciación. Por otra parte era plenamente consciente del deterioro alarmante de nuestro planeta, y me decía, como preguntándose, si se llegaría a un estado de deterioro irreversible. Y señalaba: «el corregir las cosas desviadas está en manos de científicos, políticos y de foros pluridisciplinares, que entiendan sobre el ecosistema y los problemas ambientales».

Al aproximarse el verano, Don Ángel comentaba que se reunía con su familia en Béjar. Lo consideraba el lugar de sus sueños, no sin justificación, pues cuando visité esta ciudad por su funeral, me evocó mis tránsitos de verano a través de Suiza, con mi familia hacia Munich: un lugar de frescor, en contraste con la ardiente España. Y como expresó lo que es su entorno, el poeta Gabriel y Galán, en una de sus poesías, que me sorprendió agradablemente al verla plasmada en una placa, en la Ermita del Castañar, que visité después de su entierro, y al leerla se disipó mi profunda tristeza de haber perdido al amigo entrañable, y que dice:

¡Ved la verde maravilla
de belleza y de frescura,
que puso Dios a la orilla
del desierto de Castilla
y del erial de Extremadura!

Es el arpa soberana
donde vibran los rumores

de la ciudad bejarana
que es una hermosa artesana,
rica en virtudes y amores.

Templo en que Naturaleza
puso grandiosa belleza
tan llena de majestad
desde la espléndida alteza
mira la hermosa ciudad.

Si hacer su epopeya quieres
recoge, en salmos austeros,
plegarias de sus mujeres,
rumores de sus talleres
y cantos de sus obreros.

Bejarano edén ameno,
¿Qué es lo que no podrás dar,
si para hacerte mas bueno,
puso el Señor en tu seno
la Virgen del Castañar?

Y almas y cuerpos al par
en salud podrán cantar
éste su más dulce anhelo.
¡De Béjar al Castañar
y del Castañar al cielo!

Acompañé a Don Ángel en una serie de viajes para intervenir en Congresos y reuniónes científicas nacionales e internacionales: Jena (Alemania), Madison (EE.UU.), Hamburgo (Alemania), Santa Margarita de Liguria (Italia), Ciudad de México (Méjico). Le acompañamos a él y a su hermosa familia, los miembros de su Departamento que, a la sazón, trabajábamos con él, para recibir en la Sorbona de París el doctorado «honoris causa», y después en la Embajada de Francia, la Legión de Honor. También a otras diversas reuniones científicas en España: Oviedo, Santander, Santiago de Compostela, Málaga, Pamplona, Valencia, Madrid, Salamanca, Badajoz, Palma de Mallorca y Mahón, que recuerde. En algunas de ellas para recibir el doctorado «honoris causa», como ya ha sido mencionado anteriormente por otros intervinientes. Y por último, para llevarle en coche

a la Academia, al final de su vida, cuando nuestra buena amiga académica María Cascales debió interrumpir acompañarle. Mi profundo deseo era el que pudiera haberle acompañado durante muchos años, y mi gran tristeza que nos haya dejado.

Su presencia y puntualidad siempre fueron aleccionadoras, pues era el primero en acudir a las citas. Recuerdo que en Munich, poco antes de encontrarnos, pues yo vivía con mi familia, sobrevino una tormenta con aguacero, pero Don Ángel ya estaba en el lugar acordado. Nunca se molestaba, ni hacía comentario alguno si alguien se retrasaba. Por su bondad era patente la justificación de los demás, y consideraba que cada persona ponía siempre lo mejor de sí mismo. En cierta ocasión, mientras estábamos a la espera en uno de los Congresos Científicos, no recuerdo el motivo exacto, Don Ángel, nos dijo: «Bartolomé, para el cristiano y el científico que piensa, las esperas se hacen cortas». El cristiano porque tiene mucho que agradecer a Dios, y el científico que lo busca, porque tiene temas en qué pensar.

Don Ángel podía haber vivido congratulándose de la calidad de vida alcanzada, pero no, cuando le entregaba para supervisar una tesina (ahora el DEA = diploma de estudios avanzados), tesis o trabajo científico, me lo devolvía a las pocas horas, o al día siguiente. Mi primer pensamiento era por cuestiones de forma o título. Todo lo contrario, estaba totalmente corregido y en la forma que se podía aprender de él. Aún así, se disculpaba de haber metido el lápiz. Para mí era un aprendizaje de lo que era una persona madura, y hechos similares eran clarificadores de su personalidad. Vivía como si Dios le dijese: ¿quieres tener una vida muelle? No amigo mío, ese no es tu camino..., estás aquí para servir. Don Ángel lo tenía claro, estaba ahí para servir.

El espíritu humano, que imprimió en el Departamento de Bioquímica, fue el mejor de todos por los que he pasado en mi vida profesional en España y en varios países extranjeros, de Europa y de América. A Don Ángel le gustaba la música, yo pensaba en aquella época y lo comentaba con mi mujer, que tenía organizado el Departamento como una orquesta, como en mi casa, que cada hijo estaba responsabilizado de un instrumento, en su Departamento, cada uno de nosotros estábamos responsabilizados de una faceta, aparato,

criadero, instalación radiactiva o seminarios. Al dejar el Instituto por pasar a dirigir el Área de Toxicología del Instituto de Salud Carlos III, éramos Jefes de Unidad en la década de los ochenta: María Cascales, Pilar González, Ana María Pascual-Leone, Eva Palacios, Blanca Feijoo, Manuel Benito de las Heras, José María Culebras, Fernando Escrivá, Ángel Giménez Solves, M.ª Teresa Miras Portugal, Carlos Martínez Honduvilla y Manuel López Pérez. Todos debíamos dar cuenta de ello, en las frecuentes reuniones, de una forma armoniosa. Haciendo un parangón con los compositores musicales con Don Ángel, no nos sentíamos intimidados por gestos sonoros, expresivos o vivaces, de una mentalidad beethoveniana, ni mucho menos expresaba gestos emotivos, ni marciales vibrantes y altisonantes, como la música de Chaikovski. Don Ángel era clasicista, nos trataba con una delicadeza y finura semejante a la manifestada por Haydn, y como la exquisitez, en su faceta musical, de Mozart. Su sabiduría la constaté también en su avanzada edad, en un ágape, me fijé que no tomaba nada de las mesas, al preguntarle si le acercaba algo de comida o canapés, me replicó elevando su mano con la copa de vino tinto: «esto es lo menos malo, muchas gracias Bartolomé, no deseo nada más». Con todo ello, Don Ángel ha marcado el rumbo de numerosos profesionales. Veíamos que en el Instituto de Bioquímica, hacía y vivía lo que decía organizadamente. Su filosofía era que como personas racionales, inteligentes y unidas, siempre debíamos ser capaces de encontrar convergencias y de resolver los problemas. Tenía una virtud muy destacable: su capacidad de conciliar todos los puntos de vista, de buscar siempre el acuerdo y el entendimiento. Su ejemplo nos ha sido útil en la vida profesional y en la familiar, en nuestros propios hogares. En realidad, el cristiano se halla arropado por la gran familia humana y espiritual. Como mallorquín, alejado de la mía, tomé buen ejemplo, y hoy, en esta sesión, vemos cómo Don Ángel construyó su hermosa familia aquí presente. Él está en el otro lado, en el paraíso. ¿Quién asegura que no existe? Dejémoslo a la reflexión con libertad para cada uno, como lo practicaba Don Ángel.

Me sentía amigo de Don Ángel, y le comunicaba mis expectativas. Él no contestaba con un deber o una negación, sino con una reflexión. Era un hombre liberal y se le podía pedir consejo. Cuando le manifesté la invitación y el apoyo disponible para optar a una

nueva Cátedra de Toxicología en la Universidad de las Islas Baleares, después de ayudar a la creación de la titularidad, Don Ángel reflexionó y me dijo: «¿vale la pena irse cuando usted tiene en Madrid, ya funcionando, un mejor Departamento, que no alcanzará allá con los años antes de jubilarse?» Nada más acertado. Don Ángel tenía las ideas claras, como también su espiritualidad.

Don Ángel era un hombre creyente, hondamente cristiano, y es que, en el corazón y en lo profundo de la mente, el ser humano es espiritual. Muchos le hemos oído acabar su intervención en una Sesión Necrológica diciendo: «*Vita mutatur, non tollitur*», la vida cambia, no se nos quita. Él fue fiel con la creencia heredada de los mayores, y que, abandonada por muchos, causa un vacío espiritual en la sociedad que vivimos. Un gran porcentaje de seres humanos, como entes espirituales, necesitan de Dios; otros con una fuerte vocación que ocupa su vida, sencillamente renuncian a Él, sin consecuencias inmediatas, en el ámbito de lo moral, del trato humano y en su estilo de vida. Pero la ausencia de Dios, en la gran mayoría de la sociedad, es causa de falta o carencia de principios morales y virtudes humanas. Somos testigos de lo convulsa que vive la humanidad. Los docentes de Humanidades han estado en lucha para su subsistencia, como hemos vivido por las sucesivas recogidas de firmas, para la defensa del Griego, el Latín y la Historia del Arte. En el mismo sentido, la Religión pasa por una época de inquietud para sus profesores, los padres y los alumnos, cosa inmerecida en un país democrático, con libertades y derechos humanos. Don Ángel me comentó que «la Humanidad está hoy deshumanizada, valga la redundancia». Tenía plena razón, cuando hemos visto que en el texto del Tratado, previo para la Constitución Europea, se ha evitado expresar las raíces cristianas, considerado el más fuerte lazo entre todos los países que la forman. Los dirigentes políticos de, no sólo nuestro país, sino también en otros de civilización occidental cristiana, se empeñan en borrar todo vestigio religioso y los valores de nuestra sociedad. Sin embargo, la faceta espiritual del hombre es propiedad indiscutible de vivir en libertad y de ser feliz, y esto es válido para todos los seres humanos, con rectitud de intención de cualquier religión.

Nunca oí a Don Ángel críticas a la Iglesia ni a otra religión. Algunos grandes hombres que han tenido espíritu crítico o irónico

con la Iglesia, al final de su vida de trabajo, ya maduros, al conocerla mejor, han expresado su admiración y respeto por lo que ella representa. Miguel de Unamuno, Cervantes, Juan Ramón Jiménez, Newton, Faraday, Max Planck, Leonardo da Vinci, Dante Alighieri y Einstein, con un largo etcétera, consideraban que la causa del Universo y de las Leyes de la Ciencia es Dios. Hemos escuchado o leído que científicos de prestigio se han expresado en el mismo sentido. Algunos de los aquí presentes hemos conocido al científico Ribas Marqués, que decía, sintetizando al máximo como químico orgánico, en la madurez al final de su vida: «yo sólo creo en dos cosas, en Dios y en este Papa», a la sazón Juan Pablo II. El eminente farmacólogo García Valdecasas, que fue de la Universidad de Barcelona, al ser entrevistado por nuestro compañero académico, brillante científico, Juan Tamargo, manifestó, en la Revista de Ciencias de la Salud: EIDON en su número 10 del año 2000: «Yo todavía soy religioso, y creo que el mundo en el cual vivimos y todo lo que somos lo ha hecho Alguien, no es producto de la casualidad». El reciente historiador Laín Entralgo hacía suyas las tesis de los pensadores españoles del siglo XX: Unamuno, Ortega, Zubiri y Julián Marías, coincidentes en considerar al hombre como titular de una vida que no muere con la muerte.

Haciéndonos eco de la comunicación en esta Academia del científico Losada Villasante, sobre la importancia de la luz entre Dios y los hombres o la vida humana, señaló que en las ciencias biológicas experimentales, la luz representa el inicio de la vida en las plantas, y de ellas dependen los animales y los seres humanos, como relató el citado investigador. En las interesantes y amenas publicaciones de nuestro compañero Académico González de Posada, sobre los grandes físicos, leemos que Einstein estableció que la radiación transmite inercia (masa) entre los cuerpos que emiten y absorben energía, y que puede asegurarse que los cuerpos cuyo contenido en energía es variable en alto grado, como las sales de radio, pueden confirmar su teoría. Habría que implicar los compuestos de hierro, los más numerosos en la cadena de transporte de electrones en nuestro organismo, que acogen y transfieren los electrones, y que en su movimiento, debido a los gradientes de potencial redox de sus moléculas, producen la necesaria energía vital. La luz es radiación y la radiación y la luz son dos caracteres decisivos en la Sagrada Escritura y

la tradición cristiana, anteriores a que se establecieran los mecanismos conocidos y su verdadero significado, como hoy en parte están dilucidados. Podríamos añadir que Dios no juega a los da-dos sino a los da-tres: energía-materia-movimiento, de gran significado teológico. Se impone investigar más, para que la acción confirmativa de la razón pueda conducirnos, además de la fe, a la evidencia, y con ella a una certeza de Dios, en quien Don Ángel creía con firmeza.

Finalmente, podríamos afirmar que Don Ángel se preguntaría, como Fray Luis de León: ¿Cuándo será que pueda, libre de esta prisión, volar al cielo y contemplar la verdad pura sin velo? Como el vuelo de Fray Luis de León, Don Ángel con su muerte inició el suyo, el que anhelaba su alma para gozar de toda una eternidad en presencia del Creador de la energía, la luz y del Universo, con quien Don Ángel podrá gratificarse ahora, viendo el conjunto de reacciones bioquímicas todavía por descubrir.

Doña Carmen, Mamen, Eduardo, Mari Chari, Miguel Ángel, nietos y biznietos, como habéis oído hasta ahora, y por las intervenciones que quedan, todos nos unimos unánimes a vuestro dolor, porque también es el nuestro.

Don Ángel Santos Ruiz y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, SEBBM

MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excma. Señora Doña María del Carmen Díaz Hernández-Agero de Santos Ruiz, Excmo. Señor Presidente de la RANF, Excmas. Señoras y Señores Académicos, señoras y señores:

Permítanme glosar, aunque sea de modo breve, la relación de Don Ángel Santos Ruiz con la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, SEBBM.

Comenzaré la historia en el año 1949, cuando se celebra el primer congreso internacional de bioquímica en Inglaterra y el segundo en París en 1952. Estos congresos y los posteriores sirvieron para que los científicos se dieran cuenta de que la ciencia no tenía fronteras y que era necesaria la cooperación internacional. En 1955 se crea la IUB (International Union of Biochemistry) actualmente IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), en cuyos estatutos estaba previsto que al mismo podrían pertenecer todos los comités de bioquímica de las diferentes naciones que lo solicitaran. Unos meses más tarde, en julio de 1955, estando todavía España totalmente aislada desde el punto de vista político y comercial, en una reunión del consejo ejecutivo del CSIC, se constituye el Comité Nacional de Bioquímica (CNB), del que sería Presidente Don Ángel Santos Ruiz, siendo secretario Don Alberto Sols, y se acepta a España como miembro de la IUB. Este Comité se puede considerar el embrión de la futura Sociedad Española de Bioquímica. La Concesión del Premio Nobel a Severo Ochoa en 1959 y su interés y sugerencias hacen que en la Reunión Nacional de Bioquímica de 1961, en Santander, se plantee abiertamente la creación de la Sociedad.

Los acontecimientos se precipitan cuando en julio de 1963, Don Ángel Santos Ruiz y Don Alberto Sols asisten en Oxford a la primera reunión internacional de la Biochemical Society, en la cual se plantea la creación de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica, FEBS. Este efecto catalizador acelera la creación de la Sociedad Española de Bioquímica, lo que se acepta en el Congreso celebrado en Santiago de Compostela en 1963, año que se considera como el de fundación de la SEB, actualmente SEBBM.

De la importancia y prestigio de la SEB en sus primeros años de singladura, simplemente recordar que ser miembro ordinario de la SEB era un mérito que se hacía constar en las oposiciones a Cátedra de Universidad. Don Ángel, como presidente del Consejo Nacional de Bioquímica, era miembro nato de la Junta Directiva, y así consta en la primera que comprende los años 1964-1966, y en la segunda 1966-1968, de la que también formaban parte tres distinguidos alumnos suyos de la Facultad de Farmacia de Madrid: Don Manuel Losada, Don Julio Rodríguez Villanueva y Don Federico Mayor Zaragoza.

En el primer listado de socios ordinarios de la SEB con 83 miembros, diré que más de un tercio habían sido alumnos de Don Ángel y haré especial mención a las mujeres, pues son solamente catorce, de ellas más de la mitad procedían de la Facultad de Farmacia, y seis habían realizado su tesis doctoral o comenzado su trabajo investigador en el laboratorio de Don Ángel, por orden alfabético: María Cascales, Gertrudis de la Fuente, Ana Galarza, Carmen del Amo, M.ª Dolores García Pineda y Pilar González. En las Juntas Directivas entre los años 1968 y 1972, el presidente era Don Julio R. Villanueva, vicepresidente Don Federico Mayor Zaragoza y Doña M.ª Cascales como vocal. Otros discípulos señalados que formaron parte de posteriores Juntas Directivas y Comisiones de admisión de socios ordinarios fueron, entre otros: Carmen del Amo, Pilar González, Manuel Ruiz Amil, José Antonio Cabezas, Miguel Deán y un largo etcétera.

En reconocimiento a su amplia labor como Maestro de Maestros, se concede a Don Ángel el nombramiento de Socio de Honor de la SEB en 1972, uniendo su nombre al de otros seis excepcionales científicos: Carl Cori, Ernest Gale, Hans Krebs, Manuel Lora-Tamayo, Severo Ochoa y Wendell Stanley.

Tomé conciencia de todos estos datos y de la ingente labor e importancia de Don Ángel para la SEBBM, cuando en 1996 fui elegida Secretaria de la sociedad, cargo que desempeñé durante dos años como electa y otros cuatro en funciones hasta septiembre de 2002. Durante esos años una mirada cuidadosa a las memorias me hizo reflexionar profundamente sobre el pasado y constatar la suerte que para la SEB supuso que los fundadores y pioneros fueran científicos y docentes de gran inteligencia y de gran coraje.

Me he preguntado muchas veces si realmente Don Ángel fue siempre como lo conocimos: prudente, reflexivo, sereno, sopesando cada uno de sus actos con una racionalidad absoluta, o si alguna vez fue un joven muy alegre, buen bailarín, amante de la poesía y *buen hacedor de versos*, buen estudiante y despreocupado, con todo el tiempo por delante. ¿Qué circunstancias hicieron de Don Ángel la pieza clave para mantener la antorcha de la Bioquímica en la paupérrima posguerra española? ¿Qué fuerza le permitió sobrevivir en su *noche oscura del alma*? ¿Su excepcional inteligencia? ¿Su bondadoso corazón? o ¿Sus inamovibles convicciones morales? ¿Qué refugio construyó su mente para estar a salvo de la desesperación y del derrumbe?

Me gusta pensar que su mente jugó con las moléculas que constituyen los seres vivos, que las habrá imaginado de una y mil formas, que habrá diseñado todas las transformaciones metabólicas posibles, algunas seguramente pendientes de ser descubiertas, y que de este modo la Bioquímica fue su guarida secreta, un mundo limpio, ordenado y hermoso donde todo eran y son horizontes, sin fronteras y sin límites. Sin duda pertenece don Ángel, por derecho propio, a la estirpe de los grandes maestros que son además hombres de su época y que son capaces de reconducir los cauces del pensamiento hacia la racionalidad y la esperanza.

Era además, Don Ángel, una persona muy jovial, permítanme que recuerde alguna anécdota. En 1977 el Departamento de Bioquímica era mayoritariamente femenino, y ese año tres jóvenes, inteligentes, alegres y trabajadores empezaron su tesina conmigo, Don Ángel estaba encantado y les llamaba los tres mosqueteros de M.ª Teresa que, efectivamente, eran tres. Cuando antes de las sesiones en esta Academia nos interesábamos mutuamente por las res-

pectivas familias, Don Ángel hablaba entusiasmado de cada nuevo nieto y biznieto y bromeaba diciendo que con sus hijos tenía las cuatro bases del ADN y con sus nietos y biznietos había superado los veinte aminoácidos esenciales. Era una forma de ver su pasión vital e intelectual indisolublemente unidas.

En fecha más reciente, el 28 de febrero de 2000, la SEBBM entregó la Medalla de Honor al Profesor Santos Ruiz en el salón de actos de esta Real Academia Nacional de Farmacia. Esta medalla representa el templo de la sabiduría sostenido por las columnas de la ciencia, donde no falta la columna de la doble hélice. En ese acto se dieron cita muchos de sus discípulos y escuchamos hermosas palabras cargadas de cariño y emoción. Pero ese acto fue mucho más, pues fue el lugar de reencuentro con compañeros y amigos, venidos de todas las partes de España, y se convirtió en el más hermoso regalo que don Ángel nos había hecho a todos. Estaba Don Ángel, en ese acto, rodeado de su extensa familia, su esposa, sus hijos, nietos y biznietos, su más preciado tesoro.

La figura de Don Ángel en el contexto de la SEB y de la Bioquímica española se podría resumir en una metáfora que tomaré prestada del joven escritor gallego Manuel Rivas: *Los seres humanos, a semejanza de los gusanos de seda, dejan una estela a lo largo de su existencia, y de la riqueza e intensidad de las interacciones con otros seres humanos forman los más diversos y hermosos tapices, las más fascinantes culturas («El lápiz del carpintero»)*. Consiguió Don Ángel, en una época compleja y difícil, tejer la urdimbre que ha permitido el desarrollo y la espléndida situación actual de la Bioquímica y Biología Molecular en España.

Con el imborrable recuerdo de Don Ángel en nuestra memoria, permítanme que a quien compaginó sus dos grandes amores: su familia y la bioquímica, decirle hasta siempre con los versos de Don Francisco de Quevedo:

El cuerpo es tierra, y lo será, y fue nada;
de Dios procede a eternidad la mente:
eterno amante soy de eterna amada.

Don Ángel Santos Ruiz

ANA MARÍA PASCUAL-LEONE PASCUAL
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Academia Nacional de Farmacia, Excmas. Autoridades de la Tribuna Presidencial, Excmos. Señoras y Señores Academicos, Señoras y Señores:

Quiero agradecer especialmente al Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia la oportunidad que se me brinda de decir unas palabras en homenaje a la memoria de Don Ángel Santos Ruiz, ya que mis opiniones no pueden estar elaboradas y sentidas a través del prisma de discípulo, como sucede con los distinguidos científicos que acabamos de oír; porque yo nunca fui discípula de Don Ángel. Sin embargo, desde el año setenta, en que vine a Madrid, toda mi vida profesional se ha desarrollado, durante más de treinta años, en el Instituto de Bioquímica fundado y dirigido por él en la Facultad de Farmacia. Por ello mis palabras pueden completar la semblanza de Don Ángel, aportando una visión fuera del sentimiento filial de sus discípulos y de la especial protección con la que Don Ángel beneficiaba y sentía hacía ellos.

Cuando llegué a Madrid yo había estudiado Farmacia en Barcelona y ya era Investigador Científico del CSIC. Mi sueño era poder desarrollar, por fin, la formación que durante más de tres años había adquirido en París sobre desarrollo de mamíferos y endocrinología fetal. Pertenecía en el Consejo al Patronato «Alfonso el Sabio» que abarcaba entonces a todos los Centros Mixtos, es decir, prácticamente, en aquella época, a todos los Centros de Investigación ubicados fuera de Madrid. Administrativamente me trasladaba, además, desde un Centro que era una delegación del Instituto que presidía Don Ángel en Madrid. Pero la figura de Don Ángel había aparecido ya en momentos claves de mi vida profesional de forma muy positiva para mí. Había sido Don Ángel el Ponente de mi Tesis Doctoral que yo

realicé en la Facultad de Medicina de Valencia, dirigida por García-Blanco, Catedrático de Bioquímica y Fisiología, pero para ser Doctor en Farmacia debía leer en Madrid, y, además, tenía que figurar como Director y Ponente un Catedrático de Farmacia. La primera vez que yo vi y hablé con Don Ángel fue el año 55; él era Decano y me trasladé desde Valencia para solicitarle que fuera mi Ponente, con una carta de García-Blanco y mis resultados experimentales. Yo leí la Tesis en 1956 con la máxima Calificación ante un Tribunal en Madrid presidido por él. Muy posteriormente, Don Ángel presidió también el Tribunal de mis oposiciones en Madrid para Colaborador del Consejo, en donde saqué un tercer puesto de puntuación dentro del Patronato. Así que cuando llegué en el setenta a Madrid, él sabía bien quién era yo, y yo, profesionalmente, no tenía más que recuerdos buenos de él. Incluso me apetecía trabajar en la Facultad de Farmacia. Sin embargo, intenté adscribirme a un Centro Propio del Consejo porque me parecía que tenían mejor infraestructura y posibilidades para mí. Pero Don Ángel quería que me quedara en su Centro, yo enriquecía la plantilla del Centro, puesto que ya era Investigador. Sin embargo, en el año setenta en el Instituto de Bioquímica, como se desprende de las palabras del Doctor Mayor Zaragoza, se trabajaba en Bioquímica Vegetal, para la cual yo me consideraba sin formación después de mi Tesis en la Facultad de Medicina y, mis años postdoctorales en París estudiando desarrollo de mamíferos, en donde realicé, en la Sorbona, un Diploma de Estudios Superiores.

Finalmente, pacté con Don Ángel, me dejaría seguir mi tema de investigación y me ayudaría a montar un criadero de animales, de ratas, que era indispensable para mi trabajo. A través de más de treinta años yo trabajé en su Centro, conseguí, con su ayuda, formar mi grupo de investigación y montar el criadero que actualmente sigue funcionando para todo el Instituto. La primera felicitación que recibí cuando nos dieron el Premio Reina Sofía, en 1994, fue la de Don Ángel, ya jubilado, con una tarjeta de su puño y letra que guardo cuidadosamente.

Don Ángel y yo establecimos una relación de mutuo respeto y afecto. Creo que Don Ángel tenía dos cualidades muy básicas que reflejan sabiduría y honestidad. Don Ángel sabía escuchar con benevolencia, y ello le llevaba a conocer a la gente, le proporcionaba

sabiduría humana que le hacía triunfar en las negociaciones. Su segunda cualidad era que, en su empeño por realizar sus proyectos, tenía cuidado exquisito en no bloquear el camino de la gente que percibía que quería seguir el suyo, todo ello por respeto y honestidad. En mi discurso de entrada como Académico de Número a esta Corporación, yo agradecí a Don Ángel, «la libertad de acción que me procuró a mi llegada a Madrid en 1970». Creo que Don Ángel sabía que yo le apreciaba, y que yo guardaba en su Instituto, repleto de discípulos suyos, un gran cuidado en no entorpecer esa relación especial que él guardaba y sentía hacia ellos, debida, sin duda, a su sentido de responsabilidad.

Pero, además, dentro del Centro yo disfruté de muy buenos amigos que hice y conservo, y entre ellos de la amistad de una mujer, Carmen García del Amo, Académico Correspondiente de esta Academia, ya nombrada anteriormente, y Secretaria, durante mucho tiempo, del Instituto de Bioquímica, y que quiero mencionar aquí, en este homenaje póstumo de Don Ángel, porque su fidelidad a él era inquebrantable, y a ella, que murió hace unos años, le gustaría estar aquí.

Creo, sinceramente, que si Don Ángel no hubiera tenido esas cualidades, mi trabajo en su Centro y la realización de mi investigación, hubieran sido imposibles.

Por no ser su discípula, nuestra relación y amistad era quizá más abierta, diría yo, más de amistad. Recuerdo muchas frases de él, porque a mí me gusta guardarlas y escuchar atentamente, cuando creo que merece la pena. Cuando en el año 1990 fui nombrada Directora del Instituto, al felicitarme Don Ángel, me dijo: «*La dificultad de mandar es tener que resolver los problemas de convivencia que surgen entre la gente en el trabajo y entorpecen la marcha del Centro*», cosa que comprobé rápidamente. Una vez que yo discrepé de su opinión en una Junta de Instituto, al terminar la Junta, yo creía que Don Ángel estaría enfadado, pero él me dijo a la salida: «*Usted, Ana María, es una buscadora de la verdad, por eso se dedicó a investigar*». Me desarmó de tal manera que casi le di la razón en la cuestión planteada. Creo que Don Ángel era una personalidad positiva, innovadora, que percibió la importancia de la Ciencia en un país que había salido de una guerra. Fue de una generación que tuvo que

trabajar muy duro, en circunstancias muy malas de la Universidad e Investigación de este país y, por ello, las generaciones posteriores tendremos siempre una deuda cultural importante con ellos. Su mujer y sus hijos, que junto con su trabajo, constituían su mundo, deben hoy recibir en su nombre nuestro sentido agradecimiento. Nosotros hemos tenido la gran suerte de poder disfrutar de Don Ángel largos años en esta Academia. Descanse en paz...

Sesiones Científicas

6 de octubre

A las 19,00 horas, Acto de la Fundación Casares Gil, «La I+D farmacéutica, los laboratorios y el papel de las Agencias Reguladoras de Medicamentos». Intervienen: Doctora Doña M.ª del Val Díez Rodrigálvarez, Directora de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, y el Doctor Don Javier Martínez González, Director del Departamento Médico de los Laboratorios Rovi.

13 de octubre

A las 19,00 horas, Conferencia por el Profesor Doctor Don Francisco González de Posada, «Einstein, 100 años de relatividad».

19 de octubre

A las 18,15 horas, Inauguración de la Exposición: «Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas», que realiza la Real Academia Nacional de Farmacia con la colaboración de la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF. Visita guiada a la exposición del «Legado de Enrique Moles» con el Excmo. Señor Don Francisco González de Posada, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y de Número de la Real Academia Nacional de Medicina y Comisario de la muestra.

A las 19,00 horas, Sesión Académica con motivo de la Exposición en la que intervinieron: Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia: «Motivación y objetivos de los actos»; Excmo. Señor Don Luis Miguel Enciso Recio, Académico de Número de la Real Academia de la Historia: «La edad de plata de la cultura española y su epílogo», y Excmo. Señor Don José Manuel Sánchez Ron, Académico de Número de la Real Academia Española: «Enrique Moles en el mundo de Blas Cabrera».

20 de octubre

A las 18,00 horas, Tertulia Científica sobre «Derechos de los animales *versus* investigación biológica». Moderador: Profesor Cabezas Fernández del Campo. Ponentes: Doctor Giráldez Dávila y Doctor José Ramón Alonso.

A las 19,00 horas, Presentación de la Monografía número XVIII titulada: «Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías». Intervienen: la Excma. Señora Doña Ana María Pascual-Leone Pascual, Académica de Número, que actuó como Coordinadora; el Excmo. Señor Don Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número; y el Doctor Don Adolfo Toledano Gasca, Académico Correspondiente, ambos participantes en la Monografía.

26 de octubre

A las 19,00 horas, Mesa Redonda «Balneario de Cervantes». Ponentes: Doctores Don Juan Palomares López y Doña Milagros Pozuelo Cuervo: «Análisis de la radiactividad en las aguas del Balneario Cervantes»; los Doctores Don Francisco Monturiol Rodríguez y Don Raimundo Jiménez y Ballesta, «Estudio de los suelos del Término Municipal de Santa Cruz de Mudela»; la Doctora Doña Filomena Rodríguez Caabeiro: «Estudio de la parasitología de las aguas del Balneario Cervantes», y los Doctores Doña Josefina San Martín Bacaicoa y Don Agustín Valero Castejón: «Acción terapéutica de las aguas del Balneario Cervantes».

27 de octubre

A las 19,00 horas, Conferencia de la Profesora Miras Portugal: «Receptores de feromonas: Supervivencia y sexualidad».

3 de noviembre

A las 19,00 horas, Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Intervienen: Profesor José Antonio

Cabezas Fernández del Campo: «Don Ángel Santos Ruiz: Profesor y Maestro». Profesor Federico Mayor Zaragoza: «Don Ángel: científico e investigador». Doctora María Cascales Angosto: «Ángel Santos Ruiz, académico». Doctor Bartolomé Ribas Ozonas: «Don Ángel, Maestro y Amigo». Profesora M.ª Teresa Miras Portugal: «Don Ángel Santos Ruiz y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular». Doctora Ana María Pascual-Leone Pascual: «Don Ángel Santos Ruiz».

10 de noviembre

A las 19,00 horas, Conferencia del Profesor Doctor Don Manuel González Barón: «La eutanasia: Estado actual en Europa. Una alternativa desde los sanitarios».

17 de noviembre

A las 19,00 horas, Clausura de la Exposición: «Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas». Intervienen: Profesor González de Posada: «Ángel del Campo y Enrique Moles». Profesor Jiménez Collado: «El Profesor Obdulio Fernández y la Real Academia Nacional de Medicina». Profesor Gutiérrez Jodrá: «El Profesor Obdulio Fernández y la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales». Clausura a cargo del Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Don Juan Manuel Reol Tejada.

24 de noviembre

A las 19,00 horas, Sesión conmemorativa de los Premios Nobel 2005. Coordina el Profesor Lacadena Calero.

1 de diciembre

A las 19,00 horas, Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso. Presentación a cargo del Exc-

mo. Señor Don Román de Vicente Jordana. Ponentes: Excmo. Señor Don David Martín Hernández: «Reflexiones sobre las fuentes vitales de las actuaciones del excepcional académico». Ilmo. Profesor Doctor Don Rubén López García: «En memoria de Antonio Portolés: la amistad y la inteligencia al servicio de la Microbiología», y Excma. Señora Doña M.ª del Carmen Francés Causapé: «Antonio Portolés Alonso: Académico». Clausura: Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

15 de diciembre

A las 19,00 horas, Presentación de la Monografía: «LAS ÓMICAS: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos», coordinada por la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, quien realizó la «Presentación» y habló sobre los «Autores e interés del tema». Intervinieron los Académicos Correspondientes: Profesora Doctora Doña M.ª José Gómez-Lechón Moliner: «Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos», y el Profesor Doctor Don José Enrique O'Connor Blasco: «La citómica como estrategia alternativa en farmacología y toxicología».

Noticias

La Sociedad Española de Ciencias de Animales de Laboratorio, conjuntamente con su homónima escandinava, se reunieron los días 5-7 de octubre en la ciudad de Elche. El Académico de Número Profesor Alberto Giráldez y Ex-Presidente de la misma pronunció la conferencia «Cronofarmacología en la experimentación animal».

* * *

El 6 de octubre fue nombrado Académico de Honor de esta Corporación, a título póstumo, el Profesor Enrique Moles Ormella.

* * *

El 11 de octubre nos comunican el nombramiento como Profesores Eméritos de la Universidad Complutense, de nuestros Académicos de Número, Profesores Juan Ramón Lacadena y Salvador Rivas.

* * *

El 15 de octubre nos comunican la concesión de la Medalla de Honor de la Universidad Complutense de Madrid, a título póstumo, a los Profesores Ángel Santos Ruiz y Domingo Espinós, que fueran Académicos de Número de esta Corporación.

* * *

Desde el día 19 de octubre y hasta el 17 de noviembre permaneció abierta en nuestra Sede la Exposición «Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas», con trabajos, obras de pintura y diversos objetos de Enrique Moles Ormella.

* * *

En noviembre, la Revista *Noticias Médicas,* que lleva cuarenta años en el mundo editorial de las publicaciones médicas, eligió este

año a la REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA como finalista del Premio EDIMSA a la «Institución Sanitaria del Año». *Noticias Médicas* explicó así su elección: «Presidida, desde diciembre de 2000 por el Profesor Juan Manuel Reol Tejada, ha conseguido en estos últimos años, al margen de su actividad secular, convertirse en una de las entidades académicas españolas más vivas e impulsoras de reuniones, actos, cursos, simposios y debates en los temas científicos y técnicos más importantes de la actualidad».

* * *

La Junta General de la Real Academia de Farmacia de Cataluña acordó, en su reunión del 30 de noviembre, conceder el Premio de la Academia en su convocatoria del año 2005 a la REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA, por «su estimable colaboración hace cincuenta años en la fundación de nuestra Academia, y con testimonio de estima y admiración a su incansable labor en pro de las Ciencias Farmacéuticas, estímulo y guía de las Academias de Farmacia». La entrega tendrá lugar en la reunión inaugural del curso 2006 que se celebrará el día 23 de enero.

* * *

El 1 de diciembre, en Junta General Extraordinaria, fue elegido nuevo Secretario de esta Corporación, el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo, y reelegido en su cargo de Tesorero el Excmo. Señor Don Albino García Sacristán.

* * *

Nos comunican, con fecha 5 de diciembre, la concesión de la Medalla del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos a nuestro Académico Correspondiente, el Profesor Javier Puerto Sarmiento.

* * *

El Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo, felicita a la Academia

por la organización del Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas. Felicitación que también nos envía el Excmo. Ayuntamiento de Burgos, que hace hincapié en el homenaje a un burgalés ilustre, Don Obdulio Fernández, que nuestra Corporación le hizo dentro de esos homenajes.

* * *

El 8 de diciembre, en los Actos de la Inmaculada, patrona de Farmacia, les son entregadas las medallas de Oro de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense a los Académicos de Número, Profesor Mayor Zaragoza, Profesor Doadrio Villarejo y Doctora Cascales Angosto.

* * *

Nos comunican el 9 de diciembre, que el Pleno del Consejo Federal de Farmacia de Brasil, ha concedido al Profesor Benito del Castillo García, la Comenda del Mérito Farmacéutico, la más alta condecoración de esa Entidad. El Profesor del Castillo es Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense.

* * *

El Doctor Alberto Giráldez impartió la conferencia inaugural del V Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Ciencias de Animales de Laboratorio: «Errores habituales en experimentación animal», celebrado del 7 al 10 de diciembre en Huatulco (Oaxaca, México).

* * *

El 10 de diciembre fue nombrado Colegiado de Honor del Colegio de Farmacéuticos de Ciudad Real, nuestro Presidente, el Doctor Juan Manuel Reol Tejada. La placa conmemorativa fue recogida en su nombre por el Secretario de esta Corporación, Profesor Doadrio Villarejo, en un emotivo acto presidido por Doña Ana López Casero, Presidenta del Colegio y con asistencia del Decano del Colegio de

Abogados de Ciudad Real, Don Cipriano Arteche y del Presidente de la CEOE, Don Arturo Mesa.

* * *

En Junta General celebrada el 15 de diciembre, les fueron concedidas las Medallas Carracido, máxima distinción de nuestra Institución, a la Fundación Caja Madrid, en su categoría de Oro; a Doña Rosa Basante Pol, en su categoría de Plata, y a Don José Antonio Matjí, la de Bronce, todos ellos por su contribución al desarrollo de la Real Academia Nacional de Farmacia desde su patronazgo en la Fundación Casares Gil.

* * *

Nos comunican el 15 de diciembre la entrada de la Real Academia de Farmacia de Cataluña en el Instituto de España como miembro asociado.

* * *

El 16 de diciembre fue elegido Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Salamanca, el Profesor Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de esta Corporación.

* * *

Con fecha de 22 de diciembre nos comunican el nombramiento de nuestro Presidente, Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada como Académico de Honor de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Argentina y los nombramientos de Académico Correspondiente de la Real Academia de Bellas Artes de Cádiz, Académico de Honor de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Granada y Miembro Numerario del Instituto de Estudios Canarios, a favor del Profesor González de Posada, Académico Correspondiente de nuestra Corporación.

* * *

En la Junta General Ordinaria celebrada el día 22 de diciembre, el Excmo. Señor Secretario Don Antonio Doadrio Villarejo realizó

una declaración institucional, según la cual, bajo su dirección, en su etapa como Bibliotecario de la Real Academia Nacional de Farmacia, se había completado la catalogación electrónica de los fondos bibliográficos:

> «El Bibliotecario informa que en el día de hoy y dentro del mandato presidencial del Excmo. Señor Doctor Don Juan Manuel Reol Tejada, se ha finalizado la catalogación informatizada de nuestros fondos de libros y revistas depositados en la biblioteca. El proyecto que ha sido realizado en dos años, ha contado con el siguiente equipo:
>
> Director: Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo, Bibliotecario; Doña Mar Montes, Documentalista con destino en Biblioteca; Don Marcos Orenga, administrativo informático con destino en los Servicios Informáticos, y Don Sergio Santamaría y Don Manuel Tirado que realizaron servicios de apoyo. El Bibliotecario destaca que la catalogación se ha realizado exclusivamente con personal de esta Academia y no se han utilizado servicios externos a los de esta institución.
>
> El Bibliotecario, como Director del proyecto, hace constar el inequívoco liderazgo del Presidente de esta Corporación, Doctor Reol en este proceso.
>
> Asimismo, agradece la colaboración puntual realizada por el Vicesecretario, Doctor Giráldez, en la catalogación de libros y el apoyo de la Junta General y la de Gobierno a este proyecto, que es obra de todos y motivo de gran satisfacción por el momento histórico al que estamos asistiendo».

Intervenciones en la Toma de Posesión como Académico de Honor del Doctor Joan Massagué

La revisión sobre «La vía del TGFβ en oncología básica», correspondiente a la Toma de Posesión como Académico de Honor del Doctor Massagué, celebrada el día 17 de mayo de 2005, fue publicada en el volumen 3 de los Anales de 2005 de esta Academia. Recogemos ahora en la sección de Información Académica del presente volumen, las brillantes intervenciones de los Excmos. Señores Don Federico Mayor Zaragoza y Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, que son indispensables para comprender la personalidad científica del Doctor Massagué y el significado del Acto para esta Real Corporación.

1. Respuesta del Excmo. Señor Don Federico Mayor Zaragoza en nombre de la Corporación

Excmo. Señor Presidente, Excmas. y Excmos. Señoras y Señores Académicos, queridos colegas:

Saber para prever, prever para prevenir. Nunca olvidaré aquel paseo desde el departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford hacia el Trinity College, hablando con el Profesor Hans Krebs sobre la necesidad, casi como exigencia moral, de anticiparnos, de aplicar el conocimiento disponible a tiempo. «Nuestra misión, me dijo, es contribuir a prevenir o mitigar el sufrimiento humano». Observar, interpretar, descifrar, descubrir, desvelar... los complejos procesos que concurren en la salud, en la enfermedad, en la fisiología, en la patología, para ser capaces de evitar las disfunciones antes de que tengan lugar o, al menos, de paliar su intensidad o duración.

Los farmacéuticos forman parte de los profesionales sanitarios por excelencia, de todos quienes, con distintas funciones, se esfuerzan en procurar una mejor calidad de vida. La vida, esta realidad, este asombro, este misterio. Hoy se incorpora a la Real Academia Nacional de Farmacia como Académico de Honor uno de los más acreditados vanguardistas en esta lucha incesante —la única lucha en la que deberíamos participar— en favor de la dignidad humana,

de la interpretación del lenguaje de la naturaleza, de intentar saber de qué estamos hechos y cómo somos, para que alcancemos el mayor grado de bienestar en cada momento de nuestra existencia. Desde hace años, el Doctor en Farmacia Joan Massagué, ciudadano del mundo, es el científico español cuyos trabajos han tenido mayor impacto y han merecido el reconocimiento unánime de la comunidad internacional.

En nombre de la Real Academia Nacional de Farmacia, le doy la más cordial bienvenida, no sólo por tratarse de un compañero de una trayectoria académica y científica excepcional —ambas facetas magistralmente reflejadas en el discurso «Oportunidades farmacéuticas en Oncología Básica» con que acaba de deleitarnos— sino por su perfil humano, por su simpatía, por su humildad, por su tesón, por su serenidad, por su rigor, por su templanza. Por estas cualidades, particularmente difíciles en quienes, en plena juventud, alcanzan metas tan prominentes, la figura del nuevo académico de honor resulta más infrecuente todavía.

Joan Massagué Solé nace en Barcelona el 30 de abril de 1953. Casado con Roser Salavert i Casamor. Tienen dos hijas: Eulalia y Marta. Las tres son pilares esenciales de la trayectoria humana y de la obra de Joan Massagué.

A grandes rasgos, el C. V. del nuevo académico de honor es el siguiente: Licenciado en Farmacia por la Universidad de Barcelona (1970-75); Doctor en Farmacia (Bioquímica) en la Universidad de Barcelona (1978), bajo la dirección del Profesor Joan Guinovart, presente en este acto, al que asiste con la complacencia propia de quien contempla la ascensión fulgurante de sus doctorandos y discípulos.

Señor Presidente, Señoras y Señores Académicos, Señoras y Señores: cuando me refiero a la satisfacción del Profesor Joan Guinovart y la todavía mayor del Profesor Joan Massagué, no puedo olvidar la inmensa alegría que me embargaba cada vez que mi maestro, el Profesor Santos Ruiz, de quien tanto recibí, era homenajeado o se le expresaba el reconocimiento de la comunidad farmacéutica, universitaria, investigadora, en esta misma casa o en otras instituciones, por haber impulsado, favorecido, alentado, en múltiples generaciones el gusto y la dedicación por la Bioquímica. Hoy es el primer día que acudo a esta Real Academia Nacional sin contar con su

presencia física. Y digo física porque Don Ángel estará, por la inmensa estela de su obra, de forma perenne en este espacio y, lo que es todavía más indeleble, en cada uno de nosotros. Y digo esto para que nos apresuremos siempre, aún en circunstancias adversas e inhóspitas, a la siembra, para que sin cesar abramos surcos aún en pedregales y barbechos, porque en fin de cuentas, todo fruto y, desde luego, los mejores, están siempre en deuda con sus raíces, con su semilla, con la mano que movió la azada para plantarla. Al rendir homenaje a mi maestro, quería rendirlo también al Profesor Joan Guinovart, que dirigió, a finales de la década de los setenta, los primeros pasos —que son los más comprometidos y los que marcan el camino— del Profesor Joan Massagué.

En 1979-81 es Postdoctoral Fellow de la Brown University en Rhode Island, Estados Unidos. Luego fue Asisstant Professor de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Massachussets, desde 1982 a 1989 (dos períodos de cuatro años). Desde 1989 a 2003 es Chairman of the Cell Biology Program, en el Memorial Sloan-Ketttering Cancer Centre. En 2003 al Programa de Biología se añade el de Genética. Ostenta actualmente la cátedra Alfred P. Sloan y es —desde 1990— investigador del Instituto Médico Howard Hughes.

Además de los premios extraordinarios en licenciatura y doctorado —de la Universidad de Barcelona—, quiero destacar —entre sus incontables distinciones— la beca post-doctoral Fulbright (1979), el Premio Nacional de Investigación Rey Juan Carlos I (1993), Premio Ciutat de Barcelona y Medalla de Oro de su Universidad, en 1995, así como la Alfred P. Sloan Chair del Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre. En 1999 es nombrado miembro de la American Academy of Arts & Sciences y, como un año más tarde, de la National Academy of Sciences. En 2001 recibe el Premio de la Real Academia de Farmacia de Cataluña. La Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular le concede la Medalla de Oro y la categoría de Socio de Honor en 2003. El año pasado, además del Premio Príncipe de Asturias de Investigación, fue nombrado miembro de honor de la Real Academia Nacional de Medicina y recibió la medalla del Consejo General de Colegios Farmacéuticos de España.

Desde 1993, en que se le encomendó la C. H. Li Memorial Lecture, en la Universidad de California en Berkeley hasta la dictada

este mismo año de 2005 —la Steelman Lecture en la Universidad de North Carolina— ha pronunciado 25 conferencias del mayor relieve internacional, entre las que figuran —hago una selección «hispánica»— la «Severo Ochoa», CSIC-Universidad de Madrid en 1999; la «Eladio Viñuela» en el Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM en 2003; la «Alberto Sols», en el Congreso SEBBM del mismo año; y la Keynote Address del Keystone Meeting sobre «Cancer and Development»...

Miembro del Consejo Editor del The Journal of Biological Chemistry (1987-92), The Journal of Cell Biology (1993-...), The Journal of Cellular Physiology (1996-2000), The Journal of Clinical Investigation (Senior Editor, 2002-...), ... citando algunos de los más sobresalientes, así como del Consejo Científico del Parc Científic de Barcelona y del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (2000-...).

Sus principales contribuciones científicas son:

- Receptor TGF-ß (Transforming Growth Factor) y transducción de señales: identificación bioquímica de los receptores TGF-ß (Cheifetz et al *Cell* 1987), Clonación del Receptor (López-Canillas et al., *Cell,* 1991), Mecanismo de Activación del Receptor (Wrana et al., *Nature,* 1994) y Análisis Estructural (Huse et al., *Cell,* 1999); (Mol. *Cell,* 2001).

- Vía de señalización de Smad y control transcripcional: identificación del Smad humano (Lin et al., *Nature,* 1996), mecanismo de activación del Smad (Lagna et al., *Nature,* 1996), análisis estructural del Smad (Shi et al., *Nature,* 1997), e identificación de los acompañantes transcripcionales del Smad (Wotton et al., *Cell,* 1999; Hata et al., *Cell,* 2000; Chen et al., *Cell,* 2002).

- Mecanismos de citostasis y metástasis: parada del ciclo celular en G1 por TGF-ß (Laiho et al., *Cell,* 1990), identifiación y clonación del inhibidor p27Kip CDK (Kinasa dependiente de ciclina) (Polyak et al., *Cell,* 1994), análisis estructural del complejo p27-ciclina-cdk2 (Russo et al., *Nature,* 1996), mecanismos transcripcionales citostáticos (Seoane et al., *Nature Cell Biol.,* 2001; Chen et al., *Cell,* 2002; Seoane et al., *Nature,* 2002; Seoane et al., *Cell,* 2004), y mecanismos de metástasis (Kang et al., *Cancer Cell,* 2003), siendo especialmente importante el descubrimiento

de los genes «sobre-expresados» que se hallan asociados con la capacidad metastásica.

Es de destacar —porque es una de las grandes carencias de la investigación científica en España y en Europa— que esta impresionante actividad científica, esta aportación de conocimiento, va acompañada de su aplicación, como lo demuestran siete importantes patentes en los Estados Unidos. Como botones de muestra, la primera, de 1997, con J. Roberts, A. Koff y K. Polyak, sobre moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la proteína p27 kip-1. Y, la última, en 2003, con los mismos coautores, sobre la proteína p27 aislada, las moléculas de ácidos nucleicos que la codifican, métodos de identificación de agentes que actúan sobre la misma y usos de dichos agentes.

Empezó, en 1977, con los receptores de insulina, siguió con factores de crecimiento, la identificación del receptor tipo III del factor de transformación del crecimiento (TGF-ß) como un proteoglicano de membrana, respuestas transcripcionales al TGF-ß y activina, clonación de la p57 kip2, inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, el complejo receptor de la activina, las proteínas Smad en la señalización del TGF-ß, interacciones específicas entre las proteínas Smad y los receptores TGF-ß, influencia del TGF-ß sobre Myc, Mizi y Smad para controlar el inhibidor del CDK, integración de los «pasos» Smad y Forkhead en el control de la proliferación celular neuroepitelial y el glioblastoma ... hallazgos de gran relieve comunicados en 190 publicaciones de las revistas más acreditadas. Los «silenciadores» de la expresión de algunos genes relacionados con el desarrollo tumoral son de particular relieve.

A ello hay que añadir 54 trabajos de revisión y, lo que es muy importante, el impresionante número de investigadores formados en su laboratorio: 46 en total, 10 en la actualidad.

Su participación en congresos, conferencias, simposios... pone de manifiesto, no sólo su extraordinaria notoriedad, sino su excelente salud. Porque, como ven, este boticario barcelonés, ciudadano español y norteamericano, no ha parado ni ha dado puntada sin hilo. Cuando le conocí por primera vez, pensé: «Es capaz de resistir la notoriedad. Ha llegado muy lejos, pero le queda seguramente mucho camino por delante».

Juan Massagué es capaz de pasar, sin sobresaltos, de lo más concreto a lo más general, de su mesa de laboratorio a «la mesa» del laboratorio, a todos los laboratorios. Una y otra vez ha reiterado la necesidad de potenciar la investigación básica: «La mayoría de los avances que se han venido realizando en la lucha contra el cáncer, ha declarado, se deben al trabajo llevado a cabo desde hace ya varios años por muchos laboratorios en el mundo». «Conocer en profundidad la biología molecular del cáncer, vaticinó en 1999, será la única forma de poder ponerle freno algún día».

Después de haber escuchado su espléndido discurso sobre «Oportunidades farmacéuticas en Oncología Básica», incluyo a continuación algunas de sus manifestaciones de mayor relieve sobre tema tan crucial para la humanidad en su conjunto:

«El cáncer puede definirse como una ruptura del comportamiento social de las células debido a mutaciones que dan al traste, en cuestión de días o meses, con centenares de miles de años de evolución».

«Mejor que de *cáncer es hablar de cánceres*... El cáncer no es un pico, no es el Mont Blanc. Es la cordillera de los Alpes. Tenemos que ir de un pico a otro. Y a muchos ya se ha llegado».

«Treinta años de investigación han situado a la Oncología en un punto de inflexión. Ahora vemos el futuro mucho más claro que hace quince o veinte años. Entonces estábamos —sigue con su imagen alpina— en la falda de las montañas y ahora, al haber coronado algunos picos, vemos los otros, vemos cómo son y por dónde es mejor escalarlos».

«Los billones de células que tenemos están organizadas, se comunican entre ellas y se regulan para constituir tejidos, órganos y el organismo que denominamos un humano. Hay leyes, normas sobre cuándo se divide una célula, cuándo se ha de reproducir, cuándo se ha de eliminar».

«Las células se envían señales... Cada vez entendemos mejor el sistema de señalización. Y es en este sistema donde se producen muchos de los fallos que conducen al cáncer».

«Un gran tema de estudio es la formación de vasos sanguíneos que alimentan los tumores cancerosos, la angiogénesis. Otro es la investigación de las metástasis... El 90% de las muertes por cáncer

son debidas a metástasis. En la mayoría de casos el tumor inicial no está en un órgano vital. Son las metástasis las que acaban causando la muerte. Las células cancerosas que se desplazan son eliminadas a mansalva. El sistema lucha contra ese terrorismo. Pero alguna acumula las armas y los disfraces suficientes para invadir un tejido que no es el suyo... La metástasis es el aspecto más oscuro del alma de la célula cancerosa. Pero incluso en esta área vemos la luz, el camino para progresar...».

«Hay terapias clásicas que son muy efectivas en determinados tumores... En efecto, se encontraron sustancias que mataban más a las células tumorales que a las normales y esta cualidad se ha ido exprimiendo... La nueva quimioterapia se sustenta en el entendimiento de la Biología, en la identificación de los sistemas, de los circuitos, en cómo éstos se rompen y de qué manera podemos hacer que la célula cancerígena, que depende de un circuito adulterado, sea eliminada del mismo... Hoy tenemos que intentar disponer de un fármaco contra la angiogénesis, otro contra la proliferación celular y otro más para provocar la muerte de la célula tumoral».

«Me he dedicado veinte años —concluye— a investigar sobre una de las señales, la TGF-ß, que posee una increíble capacidad de frenar la división celular. En este tiempo he descrito toda su vida de actuación: cómo es reconocida cuando llega a la membrana celular, cómo se transforma ese contacto en una cadena de reacciones químicas que llevan al núcleo el mensaje, y cómo mediante la actividad de varios genes se ejecuta el mensaje y se pone freno a la división celular... Mi sueño actual es hacer con la metástasis lo mismo que he conseguido con la TGF-ß».

Señor Presidente, Señoras y Señores Académicos, queridos colegas:

Al contemplar la trayectoria del nuevo Académico de Honor, al escucharle, al reflexionar sobre los logros alcanzados y los que quedan por alcanzar en beneficio de la humanidad doliente, son muchas las cosas que aparecen con meridiana claridad: cuáles son realmente las prioridades de toda índole que la sociedad debe reclamar a los gobernantes para que se construya, sin más tardar, este otro mundo posible que anhelamos; cuáles son las inversiones que deben efectuarse para la adecuada potenciación de unos derroteros y la supre-

sión de otros, para que seamos capaces de retener a los mejores talentos y contribuir al acervo mundial del conocimiento en su propia área geográfica, si así lo desean. Para que nos sintamos permanentemente en deuda con los más jóvenes, los más vulnerables, los más débiles, los que más sufren. Para que recordemos siempre que el porvenir está por hacer en gran medida. Y que es tiempo de acción. Es tiempo de no reposar, para esclarecer en favor de nuestros hijos horizontes hoy tan sombríos. Es tiempo de atreverse para poder seguir, como ha escrito tan bellamente Enrique Badosa en «Año 2000», «siempre adelante por la angostura de la noche», hasta el clarear de un nuevo día, de un día nuevo.

FEDERICO MAYOR ZARAGOZA
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

2. Clausura del acto por el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la RANF

Sean mis primeras palabras de gratitud para dos personas ausentes en este acto: la Ministra de Educación y el Presidente del Instituto de España, por su sincera voluntad de participar en el mismo. No están con nosotros por motivos más que justificados que me han hecho llegar personalmente junto con el mensaje de felicitación para el Doctor Massagué.

Gratitud inmensa al Presidente de Honor de la Real Academia Nacional de Medicina, Profesor Durán, maestro de la mejor cirugía española, y al Vice-Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Profesor Gutiérrez Jodra, científico clave en la física nuclear nacional. Con ambas academias mantenemos estrechos lazos. Compartimos proyectos con la de Medicina, que desearíamos ampliar hacia la de Ciencias. Gracias a ambos por honrarnos con su presencia.

Gracias, también, por su presencia en este acto, al Doctor Yllá, Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña; al Doctor Guinovart, Presidente de la Confederación de Sociedades Científicas Españolas, y a la Doctora Peña, Secretaria del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

Celebramos hoy un acto importante: el Doctor Massagué ha adquirido formalmente la condición de Académico de Honor de nuestra Academia.

Quiero subrayar tres perfiles de este acto:

1.º La desbordante personalidad científica del Doctor Massagué. Una trayectoria que se encamina firmemente hacia el Premio Nobel y que ya le hace ser el autor más citado en el mundo de la biomedicina.

El Doctor Massagué ha subrayado repetidamente sus raíces farmacéuticas y su doctorado en Farmacia en la Universidad de Barcelona. Como ha señalado nuestro Académico más universal, el Profesor Mayor Zaragoza —en su brillantísima intervención llena de referencias científicas y, también, de sentimiento y emoción—, el Doctor Massagué tiene la sencillez de los hombres grandes. Ello es un gran mérito, «porque por cada cien hombres que resisten la adversidad, sólo dos sobreviven al éxito».

2.º La presencia aquí de un tan extraordinario científico, Director del Departamento de Oncología del Sloan Kettering Center de Nueva York, significa, en mi opinión, tres cosas: *a)* La victoria de la libertad humana de elegir. Él eligió trabajar en un centro de la vanguardia científica mundial. *b)* El positivo resultado de esa elección para EE.UU., para España y para la ciencia universal. *c)* La extraordinaria repercusión que esa elección tiene para todos los pacientes.

3.º El último perfil de este acto es que nos permite hacer una breve reflexión sobre la I+D+i en España. No se trata de que, una vez más, nos deprimamos ante las cifras que estos días ha publicado la OCDE y que ponen en evidencia nuestra escasa inversión en conocimiento. Menos aún que el diagnóstico nos lleve, una vez más también, a culpabilizar al Gobierno de turno.

Pienso que las conclusiones deben ser otras: *a)* La responsabilidad de todos para crear un clima social de compromiso con la ciencia y la educación. *b)* La insistencia ante el mundo empresarial para lograr que el peso privado en la I+D+i pase del 50-55% actual al 65-70% de los países en cabeza del desarrollo mundial. *c)* Las alentado-

ras iniciativas de nuestros investigadores, que ponen de manifiesto la voluntad de cambio en la actitud de los mismos. Por ejemplo, la presencia de «spin off» para poner en relación la investigación básica y su aplicación industrial, o la «investigación traslacional» en el mundo hospitalario, que pone en conexión a básicos y clínicos, o el cada vez mayor número de patentes logradas en los centros de investigación básica.

Para terminar, permítame Doctor Massagué, una metáfora histórica. Bernat Desclot fue un gran cronista catalán del siglo XIII que vivió a caballo entre el XIII y XIV. Pues bien, de esa época gloriosa de los Condes de Barcelona y Reyes de Aragón, Jaime I, Pedro III, Alfonso III, Jaime II..., Julio Valdeón (Académico de Número de la Real Academia de la Historia) recuerda que Bernat Desclot recoge en su Crónica que una de estas figuras históricas, no recuerdo cuál ahora, dirigiéndose al Emperador de Alemania, le dijo: «Yo soy un caballero de España de la tierra de Cataluña». Pues bien, yo me figuro al Doctor Massagué en Nueva York diciendo en inglés, castellano y catalán, como su paisano, el cronista Bernat Desclot: «Yo soy un caballero de España de la tierra de Cataluña».

Estoy seguro que a partir de ahora el Doctor Massagué estará tan orgulloso de pertenecer a esta Academia como nosotros lo estamos por tenerlo como Académico de Honor.

JUAN MANUEL REOL TEJADA
Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Primer encuentro iberolatinoamericano de Academias de Farmacia: Declaración de Valparaíso

Valparaíso (Chile) 7-9 de abril de 2005

Las academias, como instituciones privilegiadas responsables de la excelencia científica, deben ejercer un indiscutible liderazgo y dar carácter y perfil a las ciencias farmacéuticas. La estabilidad de su composición, la independencia de su incorporación, la libertad de sus juicios y el desinterés económico que presiden sus actuaciones, constituyen, entre otras, características que las distinguen dentro de las organizaciones del mundo del saber. Además, son las encargadas de promover la cooperación transnacional a través de programas encaminados a la búsqueda de la calidad, como reconoce la UNESCO en su declaración mundial sobre la educación superior en el siglo XXI.

La globalización debe constituir en la actualidad un fundamento imprescindible para enfocar la política académica. Esta tendencia hacia la convergencia entre academias es irrenunciable para el desarrollo farmacéutico, dada la evidente complementariedad de las instituciones.

En consecuencia, reunidas en Valparaíso, los días 7, 8 y 9 de abril del presente año, las diferentes academias iberolatinoamericanas, tras la celebración de su Primer Encuentro Internacional, han considerado necesario resaltar el nivel de las aportaciones científicas realizadas por los distintos participantes de las mismas; haciendo especial hincapié en los temas referentes a la globalización, eficacia, seguridad y accesibilidad de los medicamentos, así como a los aspectos educativos, de armonización, científico-tecnológicos, legislativos, deontológicos y éticos que afecten al farmacéutico, como responsable último de las misiones que la sociedad le tiene asignado en el campo de la salud.

Tras la exposición en la Sesión Específica de Academias, se acordó, entre otros, dar continuidad a este tipo de encuentros, para lo que se habilitarán los medios y las actividades necesarias con el propósito de cumplir con los fines anteriormente expuestos. Así pues,

parece aconsejable establecer con carácter bianual este tipo de reuniones, para ello, se propone constituir una comisión permanente encargada de dar cumplimiento a lo anterior, así como fijar las estrategias y directrices para lograr dichos propósitos, al mismo tiempo que estimular la existencia de Academias de Farmacia en los países donde aún no han sido creadas.

Por consiguiente, se acuerda crear la Asociación Internacional de Academias de Farmacia (AIAF), teniendo como filosofía seguir extendiendo en el futuro los compromisos de todo ámbito farmacéutico en que se conjuguen los saberes específicos con los valores científicos, técnicos y humanísticos de las ciencias farmacéuticas.

En consecuencia, se adquiere el compromiso de difundir esta declaración de Valparaíso a todos los responsables de las políticas sanitaria, educativa y cultural, con la finalidad de poner a su disposición la colaboración científica y técnica que sea necesaria, como referente superior en materias de salud, especialmente en el campo de los medicamentos.

ÍNDICES DEL AÑO 2005

I. ÍNDICE DE AUTORES

II. ÍNDICE DE MATERIAS

Índice de autores

ALEU, J. Véase TEXIDÓ, L. **Pág. 821**

ÁLVAREZ BUILLA, J. Gregorio González Trigo: Una visión en el tiempo. **Pág. 475**

ANDRÉS, D.; SARRIÓN, D.; ZARAGOZA, A.; BAUTISTA, M., CASCALES, M. Phenobarbital pretreatment increases thioacetamide induced necrosis and post-necrotic regeneration in rats. **Pág. 635**

AVENDAÑO LÓPEZ, M. C. El Profesor González Trigo: esfuerzo, constancia y talento. **Pág. 461**

AVENDAÑO LÓPEZ, M. C. La innovación farmacéutica. Comentario sobre tres noticias. **Pág. 873**

BARJA, G. Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. **Pág. 783**

BAUTISTA, M. Véase ANDRÉS, D. **Pág. 635**

BEL, E. Elaboración por terceros en la formulación magistral. ¿Hasta dónde llega? **Pág. 799**

BELTRÁN, J. P. La ingeniería genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humanas. **Pág. 587**

BOTICARIO, C. ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer? **Pag. 609**

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: therapeutic potential. **Pág. 283**

CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. Nuevos datos acerca del virus causante de la pandemia de gripe de 1918-19 y su relación con los de la gripe aviar. Datos recientes relativos a éstos. **Pág. 83**

CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. Don Ángel Santos Ruiz: Profesor y Maestro. **Pág. 993**

CAMPERO CARRASCO, H. I. Análisis retrospectivo de las normas éticas y legales que rigen en la responsabilidad del farmacéutico en Bolivia. **Pág. 175**

CASCALES, M. Estallido respiratorio de los fagocitos. **Pág. 365**

CASCALES, M. Vía de la Ubiquitina-Proteosoma. **Pág. 45**

CASCALES, M. Ángel Santos Ruiz: Académico. **Pág. 1017**

CASCALES, M. Véase ANDRÉS, D. **Pág. 635**

DE LA ROSA, E. J. Véase DE PABLO, F. **Pág. 765**

DE LA TORRE, C. Aceleración y frenado de la proliferación celular. **Pág. 535**

DE PABLO, F.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; VICARIO-

ABEJÓN, C., DE LA ROSA, E. J. Old hormones of the insulin family as new developmental signals. **Pág. 765**
DEL RÍO, L. A. Véase SALAZAR, N. **Pág. 849**
DEL RÍO, L. A. Véase BRAÑA, M. F. **Pág. 813**
DOADRIO LÓPEZ, A.; DOADRIO VILLAREJO, A.; AVENDAÑO LÓPEZ, M. C.; ÁLVAREZ-BUILLA, J. Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo. **Pág. 451**
DOADRIO LÓPEZ, A. Gregorio González Trigo: mi último adiós a un gran amigo inolvidable. **Pág. 453**
DOADRIO VILLAREJO, A. Gregorio González Trigo: El amigo y el docente. **Pág. 455**
DOMÍNGUEZ CARMONA, M. Segundo Jiménez Gómez, Académico eficaz. **Pág. 979**
DOMÍNGUEZ CARMONA, M. Domingo Espinós, docente e investigador. **Pág. 711**
DOMÍNGUEZ CARMONA, M. La toxina botulinica como medicamento. **Pág. 387**
DOMÍNGUEZ CARMONA, M. Profesor Pablo Sanz Pedrero como académico y compañero. **Pág. 225**
FERNÁNDEZ, E., SÁNCHEZ, G. Relación estructura-fotoestabilidad y fototoxicidad de fluoroquinolonas. **Pág. 835**
FERNÁNDEZ BRAÑA, M.; DEL RÍO, L. A.; TRIVES, C., SALAZAR, N. La verdadera historia de la Aspirina. **Pág. 813**
FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2004. **Pág. 485**
FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Necrológica del Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez. **Pág. 729**
FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Necrológica. **Pág. 266**
FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Bibliografía. **Págs. 750, 751**
GARCÍA ASUERO, A. Calibración, comparación de métodos y estimación de parámetros en el análisis químico y farmacéutico. **Pág. 153**
GARCÍA MENDOZA, C. El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus:* la verticiliosis o «mole seca» del champiñón. **Pág. 571**
GIL ALEGRE, A. I. Véase TORRES SUÁREZ A. I. **Pág. 111**
GIRÁLDEZ DÁVILA, A. Bibliografía. **Págs. 268, 269, 270, 271, 272**
GÓMEZ, R. Véase MARÍN, P. **Pág. 659**
GONZÁLEZ DE POSADA, F. Enrique Ormella Moles (1883-1953): Farmacéutico, químico y artista. **Pág. 673**

GONZÁLEZ GONZÁLEZ, G. Segundo Jiménez Gómez: Químico agrario comprometido. **Pág. 965**

GUALIX, J. Véase MARÍN, P. **Pág. 659**

HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. Véase DE PABLO, F. **Pág. 765**

HERVÁS, C.; LEÓN, D.; SEN, R. P., MIRAS PORTUGAL, M. T. Activación de la Calcio Calmodulina quinasa II, CaMKII, por el uridin nucleósido difosfato, UDP, en neuronas granulares de cerebelo. **Pág. 439**

JIMÉNEZ COLLADO, J. Domingo Espinós, su faceta humana e impronta universitaria. **Pág. 707**

JIMÉNEZ SIERRA, M. T. Domingo Espinós, un hombre entregado a los demás. **Pág. 731**

LACADENA CALERO, J. R. Los premios Nobel 2004 en Fisiología o Medicina y Química. La importancia de los olores y del «Beso de la muerte». Presentación. **Pág. 5**

LEÓN, D. Véase HERVÁS, C. **Pág. 439**

LÓPEZ MATEOS, F. Segundo Jiménez: el Químico, el Maestro, el Amigo. **Pág. 951**

MARÍN, P.; GÓMEZ, R., GUALIX, J. Los receptores de nucleótidos P2Y reducen la entrada de calcio inducida por despolarización en terminales sinápticos de cerebro medio de rata. **Pág. 659**

MARSAL, J. Véase TEXIDÓ, L. **Pág. 821**

MASSAGUÉ, J. The TGFβ pathway in basic oncology. **Pág. 525**

MAYOR ZARAGOZA, F. Don Ángel: científico e investigador. **Pág. 1007**

MENÉNDEZ, J. C. Nuevos antitumorales de origen marino. **Pág. 341**

MIÑONES TRILLO, J. Figura de Don Pablo Sanz en la Universidad de Santiago de Compostela. **Pág. 217**

MIRAS PORTUGAL, M. T. Carta a Don Pablo. **Pág. 235**

MIRAS PORTUGAL, M. T. Necrológica. **Págs. 514, 747**

MIRAS PORTUGAL, M. T. Receptores olfativos: El perfume del éxito. **Pág. 15**

MIRAS PORTUGAL, M. T. Don Ángel Santos Ruiz y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, SEBBM. **Pág. 1033**

MIRAS PORTUGAL, M. T. Véase HERVÁS, C. **Pág. 439**

MONGE VEGA, A. Innovación de medicamentos en un nuevo milenio. **Pág. 861**

NAVARRO, P. Véase TEXIDÓ, L. **Pág. 821**

PASCUAL-LEONE PASCUAL, A. M. Espinós Académico. **Pág. 721**

PASCUAL-LEONE PASCUAL, A. M. Don Ángel Santos Ruiz. **Pág. 1037**

PINTOR, J. Nuevas perspectivas farmacológicas de la melatonina en el Tratamiento de las Patologías Oculares. **Pág. 429**

PROUS COCHS, J. Medicamentos del año 2004. Perspectiva histórica de la investigación y el desarrollo. **Pág. 867**

QUEVEDO, F. Necrológica. **Pág. 748**

RIBAS OZONAS, B. Don Ángel: maestro y amigo. **Pág. 1023**

RODRÍGUEZ ARTALEJO, A. La máquina de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. **Pág. 127**

ROMBAUT, B. History and future of polivaccination, a personal account. **Pág. 321**

ROS, E. Véase TEXIDÓ, L. **Pág. 821**

SALAZAR, N.; TRIVES, C., DEL RÍO, L. A. Capacidad de dosificación de vehículos semisólidos en cápsulas duras conteniendo piroxicam 20 mg. **Pág. 849**

SALAZAR, N. Véase BRAÑA, M. F. **Pág. 813**

SÁNCHEZ, G. Véase FERNÁNDEZ, E. **Pág. 835**

SARRIÓN, D. Véase ANDRÉS, D. **Pág. 635**

SEN, R. P. Véase HERVÁS, C. **Pág. 439**

SOLSONA, C. Véase TEXIDÓ, L. **Pág. 821**

TAMARGO, J. Nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. **Pág. 905**

TENA NÚÑEZ, G.; JIMÉNEZ COLLADO, J.; DOMÍNGUEZ CARMONA, M.; PASCUAL-LEONE PASCUAL, A. M.; FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C., JIMÉNEZ SIERRA, M. T. Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez. **Pág. 703**

TENA NÚÑEZ, G. Perfil humano de Domingo Espinós. **Pág. 705**

TEXIDÓ, L.; ROS, E.; NAVARRO, P.; ALEU, J.; MARSAL, J., SOLSONA, C. Cholinergic currents in *Xenopus* oocytes transplanted with human brain membranes. **Pág. 821**

TORRES SUÁREZ A. I., GIL ALEGRE, M. E. Globalización de los requisitos para la comercialización de medicamentos: importancia de la humedad ambiental en el diseño de los estudios de estabilidad. **Pág. 111**

TRIVES, C. Véase SALAZAR, N. **Pág. 849**

TRIVES, C. Véase BRAÑA, M. F. **Pág. 813**

VICARIO-ABEJÓN, C. Véase DE PABLO, F. **Pág. 765**

VILAS SÁNCHEZ, V.; MIÑONES TRILLO, J.; DOMÍNGUEZ CARMONA, M, MIRAS PORTUGAL, M. T. Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero. **Pág. 207**

VILAS SÁNCHEZ, V. Don Pablo Sanz, mi profesor. **Pág. 209**

ZARAGOZA, A. Véase ANDRÉS, D. **Pág. 635**

Índice alfabético de materias

AAS. **Pág. 813**
Acalasia. **Pág. 387**
Ácido acetilsalicílico. **Pág. 813**
Ácidos grasos. **Pág. 783**
ADN. **Pág. 783**
Agaricus bisporus. **Pág. 571**
Alzheimer. **Pág. 822**
Antitumorales. **Pág. 341**
Arrugas. **Pág. 387**
Aspirina. **Pág. 813**
Bolivia. **Pág. 175**
Banco de cerebros. **Pág. 822**
Brassica napus. **Pág. 587**
CaMKII. **Pág. 439**
Cáncer. **Págs. 284, 610**
Cápsulas. **Pág. 849**
CDKs. **Pág. 526**
Célula cromafín. **Pág. 127**
Células madre. **Pág. 766**
Cerebelo. **Pág. 439**
Cicatrización corneal. **Pág. 429**
Ciclinas. **Pág. 535**
Ciclo celular. **Pág. 526**
Cistitis intersticial. **Pág. 284**
Compuestos marinos. **Pág. 341**
Corrientes nicotínicas neuronales. **Pág. 822**
Córtex humano. **Pág. 822**
Daño hepático. **Pág. 636**
Degradación proteínas. **Págs. 5, 45**
Distonías. **Pág. 387**
Dolor visceral. **Pág. 284**
Eichengrün. **Pág. 813**
END1. **Pág. 587**
Enfermedad de Parkinson. **Pág. 284**
Enfermedad granulomatosa crónica. **Pág. 365**
Enfermedad periférica vascular. **Pág. 284**
Envejecimiento. **Pág. 783**
Enzimas líticos. **Pág. 571**
Epitelio olfativo. **Pág. 15**
Erradicación. **Pág. 322**
Espinós Pérez, Domingo. **Pág. 703**
Estabilidad. **Págs. 111, 849**
Ética profesional. **Pág. 175**
Exocitosis. **Pág. 127**
Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I. **Pág. 766**
Fallo renal. **Pág. 284**
Fenobarbital. **Pág. 636**
Fibrosis cística. **Pág. 284**
Flavocitocromo b558. **Pág. 365**
Fluoroquinolonas. **Pág. 835**
Formulación. **Pág. 849**
Formulación magistral. **Pág. 799**
Fotodegradación. **Pág. 835**
Fototoxicidad. **Pág. 835**
Glaucoma. **Pág. 429**
Glucogalactomanano. **Pág. 571**
González Trigo, Gregorio. **Pág. 451**
Gripe (1918-19). **Pág. 84**
Gripe aviar. **Pág. 84**
Hemaglutinina. **Pág. 84**
Hidrofobina. **Pág. 571**
Hiperhidosis. **Pág. 387**

Historia. **Págs. 175, 813**
Humedad. **Pág. 111**
ICH. **Pág. 111**
Jiménez Gómez, Segundo. **Pág. 949**
Lectina. **Pág. 571**
Legislación farmacéutica. **Pág. 175**
Líneas rectas. **Pág. 153**
Longevidad. **Pág. 783**
Lycopersicon esculentum. **Pág. 587**
Melatonina. **Pág. 429**
Memoria Anual de Secretaría. Año 2004. **Pág. 485**
Metástasis. **Pág. 526**
Micoparasitismo. **Pág. 571**
Mínimos cuadrados. **Pág. 153**
Mitocondrias. **Pág. 783**
NADPH oxidasa. **Pág. 365**
Necrológica. **Pág. 266**
Neurogénesis. **Pág. 766**
Neuraminidasa. **Pág. 84**
Neuronas granulares. **Pág. 439**
Neurosecreción. **Pág. 127**
Neutrófilos. **Pág. 365**
Nicotiana tabacum. **Pág. 587**
Nutrición. **Pág. 610**
Osteoporosis. **Pág. 284**
Oocitos de Xenopus. **Pág. 822**
Pared celular. **Pág. 571**
Partenocarpia. **Pág. 587**
Piridoacridinas. **Pág. 341**
Pisum sativum. **Pág. 587**
Plantas transgénicas androestériles. **Pág. 587**
Polisacáridos. **Pág. 571**
Poliubiquitinación. **Pág. 45**
Presión intraocular. **Pág. 429**
Prevención. **Pág. 610**
Proinsulina. **Pág. 766**
Proteínas. **Pág. 571**
Proteolisis. **Pág. 45**
Proteosoma 26S. **Pág. 45**
Purinérgico. **Pág. 439**
Purinoceptores. **Pág. 284**
Quinasas dependientes de ciclinas. **Pág. 535**
Radicales libres. **Pág. 783**
Receptores de nucleótidos. **Pág. 439**
Receptores olfativos. **Págs. 5, 15**
Receptores P2Y. **Págs. 439, 659**
Receptores siete hélices. **Pág. 15**
Regeneración hepática. **Pág. 636**
Regulación presináptica. **Pág. 659**
Replicación. **Pág. 153**
Restricción calórica. **Pág. 783**
Rutas de chequeo. **Pág. 535**
Sanz Pedrero, Pablo. **Pág. 207**
Santos Ruiz, Ángel. **Pág. 991**
Señal de calcio. **Pág. 439**
Sialidasa. **Pág. 84**
Sinaptotagmina. **Pág. 127**
Síntesis orgánicas. **Pág. 341**
Sistema olfativo. **Pág. 5**
Smad. **Pág. 526**
SNARE. **Pág. 127**
Terminales sinápticas. **Pág. 659**
TGFβ. **Pág. 526**
Tioacetamida. **Pág. 636**
Toxina botulínica. **Pág. 387**
Transmisión de señales antimitogénicas. **Pág. 535**
Transplante de membrana. **Pág. 822**
Triprostatinas. **Pág. 341**

Trombosis. **Pág. 284**
Ubiquitinas. **Págs. 5, 45**
Vacuna. **Pág. 322**
Vacunación. **Pág. 322**
Verticillium fungicola. **Pág. 571**
Vías olfativas. **Pág. 15.**
Virus de la polio. **Pág. 322**
Viscosidad. **Pág. 849**
Vitamina C. **Pág. 111**

RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

1. Publicaciones Periódicas

1.1. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Tomo I, Año 1932, núms. 1-4
Tomo II, Año 1933, núms. 1-4
Tomo III, Año 1934, núms. 1-4
Tomo IV, Año 1935, núms. 1-4
Tomo V, Año 1936, núms. 1-4
2.ª Época (Año VI), Tomo I, Año 1940, núms. 1-6
2.ª Época (Año VII), Tomo II, Año 1941, núms. 1-6
2.ª Época (Año VIII), Tomo III, Año 1942, núms. 1-6
Año IX, 1943, núms. 1-6
Año X, 1944, núms. 1-6
Año XI, 1945, núms. 1-4
Año XII, 1946, núms. 1-4
Año XIII, 1947, núms. 1-6
Año XIV, 1948, núms. 1-6
Año XV, 1949, núms. 1-6
Año XVI, 1950, núms. 1-6
Año XVII, 1951, núms. 1-6
Año XVIII, 1952, núms. 1-6
Año XIX, 1953, núms. 1-6
Año XX, 1954, núms. 1-6
Año XXI, 1955, núms. 1-6
Año XXII, 1956, núms. 1-6
Año XXIII, 1957, núms. 1-6
Año XXIV, 1958, núms. 1-6
Año XXV, 1959, núms. 1-6
Volumen XXVI, Año 1960, núms. 1-6
Volumen XXVII, Año 1961, núms. 1-6
Volumen XXVIII, Año 1962, núms. 1-6
Volumen XXIX, Año 1963, núms. 1-6
Volumen XXX, Año 1964, núms. 1-6

Volumen XXXI, Año 1965, núms. 1-6
Volumen XXXII, Año 1966, núms. 1-6
Volumen XXXIII, Año 1967, núms. 1-4
Volumen XXXIV, Año 1968, núms. 1-4
Volumen XXXV, Año 1969, núms. 1-4
Volumen XXXVI, Año 1970, núms. 1-4
Volumen XXXVII, Año 1971, núms. 1-4
Volumen XXXVIII, Año 1972, núms. 1-4
Volumen XXXIX, Año 1973, núms. 1-4
Volumen XL, Año 1974, núms. 1-4
Volumen XLI, Año 1975, núms. 1-4
Volumen XLII, Año 1976, núms. 1-4
Volumen XLIII, Año 1977, núms. 1-4
Volumen XLIV, Año 1978, núms. 1-4
Volumen XLV, Año 1979, núms. 1-4
Volumen XLVI, Año 1980, núms. 1-4
Volumen XLVII, Año 1981, núms. 1-4
Volumen XLVIII, Año 1982, núms. 1-4
Volumen XLIX, Año 1983, núms. 1-4
Volumen L, Año 1984, núms. 1-4
Volumen LI, Año 1985, núms. 1-4
Volumen LII, Año 1986, núms. 1-4
Volumen LIII, Año 1987, núms. 1-4
Volumen LIV, Año 1988, núms. 1-4
Volumen LV, Año 1989, núms. 1-4
Volumen LVI, Año 1990, núms. 1-4
Volumen LVII, Año 1991, núms. 1-4
Volumen LVIII, Año 1992, núms. 1-4
Volumen LIX, Año 1993, núms. 1-4
Volumen LX, Año 1994, núms. 1-4 y apéndice
Volumen LXI, Año 1995, núms. 1-4 y apéndice
Volumen LXII, Año 1996, núms. 1-4
Volumen LXIII, Año 1997, núms. 1-4
Volumen LXIV, Año 1998, núms. 1-4
Volumen LXV, Año 1999, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXVI, Año 2000, núms. 1-4.
Volumen LXVII, Año 2001, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXVIII, Año 2002, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXIX, Año 2003, núms. 1-4 y extraordinario.

Volumen LXX, Año 2004, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXXI, Año 2005, núm. 1-4

Agotados los años desde 1932 a 1969 completos.

Agotado núm. 2, Año 1977, Vol. XLIII; núms. 1 y 2, Año 1978, Vol. XLIII; número extraordinario, Año 2002, Vol. LXVIII.

1.2. *Anuarios*

— Anuario núm. 1, Año 1948
— Anuario núm. 2, Año 1949
— Anuario núm. 3, Año 1950
— Anuario núm. 4, Año 1951
— Anuario núm. 5, Año 1952
— Anuario núm. 6, Año 1953
— Anuario núm. 7, Año 1954
— Anuario núm. 8, Año 1955
— Anuario núm. 9, Año 1956
— Anuario núm. 10, Año 1957
— Anuario núm. 11, Año 1958
— Anuario núm. 12, Año 1959
— Anuario núm. 13, Año 1960
— Anuario núm. 14, Año 1961
— Anuario núm. 15, Año 1962
— Anuario núm. 16, Año 1963
— Anuario núm. 17, Año 1964
— Anuario núm. 18, Año 1965
— Anuario núm. 19, Año 1966
— Anuario núm. 20, Año 1967
— Anuario núm. 21, Año 1968
— Anuario núm. 22, Año 1969
— Anuario núm. 23, Año 1970
— Anuario núm. 24, Año 1971
— Anuario núm. 25, Año 1972
— Anuario núm. 26, Año 1973
— Anuario núm. 27, Año 1974
— Anuario núm. 28, Año 1975
— Anuario núm. 29, Año 1976

— Anuario núm. 30, Año 1977
— Anuario núm. 31, Año 1978
— Anuario núm. 32, Año 1979
— Anuario núm. 33, Año 1980
— Anuario núm. 34, Año 1981
— Anuario núm. 35, Año 1982
— Anuario núm. 36, Año 1983
— Anuario núm. 37, Año 1984
— Anuario núm. 38, Año 1985
— Anuario núm. 39, Año 1986
— Anuario núm. 40, Año 1987
— Anuario núm. 41, Año 1988
— Anuario núm. 42, Año 1989
— Anuario núm. 43, Año 1990
— Anuario núm. 44, Año 1991
— Anuario núm. 45, Año 1992
— Anuario núm. 46, Año 1993
— Anuario núm. 47, Año 1995
— Anuario núm. 48, Año 1996
— Anuario núm. 49, Año 1997
— Anuario núm. 50, Año 1998
— Anuario núm. 51, Año 1999
— Anuario núm. 52, Año 2000
— Anuario núm. 53, Año 2001
— Anuario núm. 54, Año 2002
— Anuario núm. 55, Año 2003.
— Anuario núm. 56, Año 2004.
— Anuario núm. 57, Año 2005.

Agotados núms. 1 al 27 (1948-1974); núm. 31 (1978); núm. 33 (1980); núm. 52 (1999).

2. Monografías

2.1. *Monografías de Aguas Mineromedicinales*

Caldelas de Tuy (Agotada)	1968
Caldas de Cuntis	1974
Montemayor (Agotada)	1975

Corconte (Agotada)	1976
Ledesma (Agotada)	1977
Solán de Cabras (Primera edición agotada)	1978
(Segunda edición) (Agotada)	1980
Lanjarón	1980
Carabaña	1981
Alhama de Aragón	1983
Caldas de Montbui	1984
Fuente Amarga de Chiclana de la Frontera	1985
Archena	1986
Fortuna	1987
Arnedillo	1988
Caldas de Bohi	1989
Alange	1990
El clima en algunos balnearios	1990
Fitero	1991
La Toja	1993
Lugo	1994
Blancafort	1995
Hervideros de Cofrentes	1998
Carratraca	1999
El Paraíso de Manzanera	2001
Alhama de Granada (Agotada)	2002
Balneario de Jaraba (Agotada)	2004

2.2. *Serie de monografías de actualización en Ciencias Farmacéuticas*

— Diseño de Medicamentos. Publicada en colaboración con Farmaindustria en 1994.
Coordinador: Doctor Arturo Mosqueira Toribio.
— Proliferación celular y cáncer. Publicada en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer en 1994.
Coordinadores: Doctora María Cascales y Doctor Julio Rodríguez Villanueva.
— Autoinmunidad. Algunos aspectos básicos y clínicos. Publicada en colaboración con la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo en 1996.
Coordinador: Doctor Antonio Portolés Alonso.

— Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.
Coordinador: Doctora María Cascales Angosto.
— Los residuos y sus riesgos para la salud. Publicada en colaboración con ENRESA, TEDEC-MEIJI FARMA, CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1998.
Coordinador: Doctor Segundo Jiménez Gómez.
— Alimentos y Salud, 2000.
Coordinador: Doctor Bernabé Sanz Pérez.
— Salud, Educación y Energía. Recursos cualificados para el siglo XXI. Publicada en colaboración con ENRESA y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2001.
Coordinador: Doctor Segundo Jiménez Gómez.
— Proliferación celular y cáncer 2000. Publicada en colaboración de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, 2001.
Coordinador: Doctora María Cascales Angosto.
— Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca, 2001.
Coordinador: Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
— La salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea. Foro de reflexión y difusión del conocimiento (29 de octubre a 8 de noviembre del 2001), 2002.
Coordinador: Doctor León Villanúa Fungairiño.
— Bioquímica y Fisiopatología del Envejecimiento, 2003.
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto, Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo y Doctor Pedro García Barreno.
— Temas escogidos de Seguridad Alimentaria, 2003.
Coordinadores: Doctor Bernabé Sanz Pérez y Doctor Manuel Domíguez Carmona.
— Citocromo P450. 2004.
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto y Doctora M.ª José Gómez Lechón.
— Nuevos Avances en Medicamentos, 2004.

Coordinadores: Doctora M.ª Carmen Avendaño y Doctor Juan Tamargo Menéndez.

— Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo, 2005.
Coordinador: Doctor Manuel Domínguez Carmona.

— Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. ¿Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos?, 2005.
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto, Doctora M.ª José Gómez-Lechón y Doctor José E. O'Connor Blasco.

— Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías, 2005.
Coordinador: Doctora Ana María Pascual-Leone Pascual.

2.3. *Otras Monografías*

— Sesión Científica en homenaje al Excmo. Señor Don Rafael Roldán y Guerrero en el centenario de su nacimiento. Año 1989 (Agotado).

— Número monográfico conmemorativo del II Centenario de la muerte de Lavoisier. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1994.

— Número monográfico sobre temas de Actualidad Farmacológica. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1995.

— Sesión Científica en homenaje a Severo Ochoa. En prensa.

— Ayer y hoy de las Academias. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— El Genoma Humano. Ciencia y Ética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— Toxicología Ambiental. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— Farmacocinética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— Biotecnologías aplicadas a la producción de medicamentos y vacunas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— Patentes y Biopatentes. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— Parasitismo y desarrollo. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Patogenia de iones metálicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Uso actual de las plantas medicinales cultivadas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— El uso ilegítimo de los agentes químicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— El SIDA. Un reto a la ciencia y a la sociedad. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Clausura de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Investigación y siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
— Prescripción, dispensación y evidencia científica (Medicina basada en la evidencia). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
— Las especialidades farmacéuticas genéricas y los precios de referencia. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.
— Genómica y Farmacogenómica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
— La Universidad de hoy y los farmacéuticos de mañana. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
— Infección por VIH y SIDA. Publicada en colaboración con SEISIDA (Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA); Instituto de Salud Carlos III; GlaxoSmithKline y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
— Farmacoeconomía e investigación de resultados en la salud. Principios y práctica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
Coordinador: Doctor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y Doctor Javier Soto Álvarez.

— Sesión extraordinaria conmemorativa del centenario del nacimiento del Excmo. Señor Don José María Albareda Herrera. Coordinador: Antonio Portolés Alonso (separata del núm. 2; Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia), 2002.
— Modificadores de la respuesta biológica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
— Autocuidado de la Salud. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Coordinación: Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP), 2003.
— Transferencias y coordinación farmacéutica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
— Investigación y Siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
— Síndrome agudo respiratorio grave y gripe aviar. Publicada en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina.

3. Facsímiles

— Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica de Pedro Gutiérrez Bueno (Madrid, 1815). Prologado por la Doctora M.ª del Carmen Francés Causapé, 1994.
— Dissertacion hydraulico-pharmaceutica sobre el origen de las aguas de Hardales, su verdadero analysis chymico, y medicinales virtudes. De Juan José García (Málaga, 1759). Prologada por la Doctora M.ª del Carmen Francés Causapé, 1995.
— Concordia Aromatariorum Caesaraugstanensium DDLIII. Prologada por la Doctora M.ª del Carmen Francés Causapé. Publicada con la colaboración de la Real Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
— Edición facsímil de los discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Señor Don José María Albareda Herrera, 2002.
— Edición facsímil del Diccionario Biográfico y Bibliográficos de Autores Farmacéuticos Españoles. Por el Excmo. Señor Don

Rafael Roldán y Guerrero. Tomo I. Presentación por Doctor Don Antonio Portolés Alonso y prologado por la Doctora M.ª del Carmen Francés Causapé, 2003.

4. Sesiones necrológicas

— Excmo. Señor Don Enrique Otero Aenlle, 1992.
— Excmo. Señor Don Felipe Calvo y Calvo, 1992.
— Excmo. Señor Don Alfredo Carrato Ibáñez, 1995.
— Excmo. Señor Don Juan Manuel López de Azcona, 1996.
— Excmo. Señor Don Octavio Carpena Artés, 1997.
— Excmo. Señor Don Víctor Villanueva Vadillo, 1998.
— Excmo. Señor Don Eugenio Sellés Martí, 1998.
— Excmo. Señor Don Ángel Vian Ortuño, 2000.
— Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio, 2000.
— Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro, 2000.
— Excmo. Señor Don Manuel Martel San Gil, 2001.
— Excmo. Señor Don Manuel Gómez-Serranillos, 2004.
— Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero, 2005.
— Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo, 2005.
— Excmo. Señor Don León Villanúa Fungairiño, 2005.
— Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez, 2005.
— Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez, 2005.
— Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz, 2005.
— Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso, 2005.

5. Discursos leídos en las sesiones inaugurales de Curso

— La vida *in vitro*. Por el Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Año 1969. Agotado.
— El alma de la Farmacia. Por el Excmo. Señor Don Eugenio Sellés Martí. Año 1970. Agotado.
— La contaminación del ambiente y su influencia en la vida. Por el Excmo. Señor Don Juan Manuel López de Azcona. Año 1971.
— Los medicamentos de ayer y de hoy. Por el Excmo. Señor Don Guillermo Folch Jou. Año 1972.
— La química médica ante el futuro. Por el Excmo. Señor Don Ramón Madroñero Peláez. Año 1973.

— La revolución farmacéutica. Por el Excmo. Señor Don Manuel Jáuregui González. Año 1974.
— Consideraciones sobre la crisis de energía y de materias primas. Por el Excmo. Señor Don Víctor Villanueva Vadillo. Año 1975.
— El problema de la creación de nuevos medicamentos. Por el Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio. Año 1976.
— El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Por el Excmo. Señor Don Guillermo Folch Jou. Año 1977. Agotado.
— Momentos estelares del pensamiento científico. Por el Excmo. Señor Don Enrique Otero Aenlle. Año 1978.
— Problemas de la utilización de la microbiología con fines bélicos. Por el Excmo. Señor Don Eliseo Gastón de Iriarte. Año 1979. Agotado.
— La edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos. Por el Excmo. Señor Don Ángel Hoyos de Castro. Año 1980.
— Consideraciones históricas sobre la porcelana. Por el Excmo. Señor Don Vicente Aleixandre Ferrándiz. Año 1981.
— Anecdotario microbiano. Por el Excmo. Señor Don Lorenzo Vilas López. Año 1982.
— Consideraciones sobre la evolución farmacognóstica. Por el Excmo. Señor Don Manuel Gómez Serranillos. Año 1983.
— Técnica y medio ambiente. Por el Excmo. Señor Don Ángel Vian Ortuño. Año 1984.
— Álbaro Alonso Barba. Un metalurgo del siglo de Oro. Por el Excmo. Señor Don Felipe Calvo y Calvo. Año 1985.
— La ultracentrífuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular. Por el Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero. Año 1986. Agotado.
— La biosfera y el hombre. Por el Excmo. Señor Don Emilio Fernández Galiano. Año 1987.
— Del complejo droga a fármaco estructuralmente específico. Por el Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo. Año 1988.
— Bases experimentales en la farmacología y terapéutica del dolor. Por el Excmo. Señor Don Perfecto García de Jalón y Hueto. Año 1989.
— El grave peligro de pensar. Por el Excmo. Señor Don Román de Vicente Jordana. Año 1990.

— La contaminación ambiental y sus consecuencias biológicas y climatológicas. Por el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López. Año 1991.
— Sistema Nervioso Central (SNC). Por el Excmo. Señor Don Alfredo Carrato Ibáñez. Año 1992.
— El universo del medicamento. Por el Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro. Año 1993.
— Alimentación y cáncer. Por el Excmo. Señor Don Manuel Ortega Mata. Año 1994.
— Legislación y métodos en el control toxicológico de compuestos, residuos y vertidos. Por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas. Año 1995.
— Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario en una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento. Por el Excmo. Señor Don Antonio Monge Vega. Año 1996.
— Impresiones sobre Severo Ochoa. Por el Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva. Año 1997.
— Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos. Por el Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio. Año 1998.
— Farmacología de la Inflamación. Por el Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez. Año 1999.
— Moléculas y comunicación biológica. Por el Excmo. Señor Don Manuel Ruiz Amil. 2000.
— Supervivencia e individualidad en Biología. Por el Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso. Año 2001.
— Proteínas del estrés. Implicaciones clínicas y objetivos terapéuticos. Excma. Señora Doña María Cascales Angosto. Año 2002.
— Terapéutica farmacológica en el anciano. Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Año 2003.
— La conservación del suelo. Base de su sostenibilidad y soporte de salud. Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez. Año 2004.
— Avances en Geobotánica. Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez. Año 2005.

6. Otras publicaciones

— Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Por el Excmo. Señor Don Rafael Roldán Guerrero. Tomo I, Año 1963. Agotado. Tomos II y III, Año 1975. Tomo IV, Año 1976.
— Código Deontológico Farmacéutico. Editado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Año 1991.
— Estatutos y Reglamento de la Real Academia de Farmacia. Textos refundidos. Año 1992.
— Tríptico explicativo de «El Museo de la Real Academia de Farmacia». Año 1995.
— Colección de tarjetas postales sobre el «Museo de la Real Academia de Farmacia». Por la Excma. Señora Doña M.ª del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1998.
— Jornada sobre Atención Farmacéutica. Año 1998.
— Avances de la ciencia a través del Premio Nobel. Por el Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Año 1998.
— El Museo de la Real Academia de Farmacia. Por la Excma. Señora Doña M.ª del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1999.
— Historia de la Real Academia de Farmacia. Por el Excmo. Señor Don Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo. Revisado, anotado e ilustrado por la Excma. Señora Doña M.ª del Carmen Francés Causapé. Año 2002.

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Política Editorial

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral que publica trabajos de investigación básica o aplicada relacionados con las ciencias farmacéuticas y afines.

2. Serán aceptados y considerados para publicación, aquellos manuscritos que no hayan sido publicados previamente (excepto resúmenes), que actualmente no estén siendo revisados en otras revistas, que su publicación haya sido aprobada por todos los autores y tácitamente o explícitamente por las autoridades responsables de los laboratorios donde se ha desarrollado el trabajo, y que si es aceptado, no será publicado en otra revista en la misma forma, en el mismo o diferente idioma, sin el consentimiento de los Editores.

3. El manuscrito original, una copia y la versión electrónica en CD, se enviará, con la correspondiente carta de presentación, a la siguiente dirección:

Doctora María Teresa Miras Portugal
Editora de los ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Real Academia Nacional de Farmacia
C/ Farmacia, 11
28004 Madrid
España
Fax: 91 531 03 06

Existe la posibilidad de enviar el manuscrito en formato electrónico como archivo adjunto a la siguiente dirección: edicion@ranf.com. Tanto el texto como las figuras deberán ser enviadas en archivos separados. Los formatos aceptados son: .doc (Word) para el texto, y formato TIFF, JPG o PPT (Power Point) para las figuras.

4. Tipos de Manuscritos.

La revista considerará para publicar lo siguiente:

— REVISIONES: no deben tener una extensión superior a las 4.000 palabras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas. Aunque la mayor parte de las revisiones serán invitaciones a petición de la Comisión Editorial, los autores interesados en contribuir con revisiones deben contactar previamente con el Editor.
— ARTÍCULOS ORIGINALES: no deben tener una extensión superior a 4.000 palabras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas.
— COMUNICACIONES BREVES: artículos breves y definitivos. El manuscrito debe ser identificado como tal en la carta de presentación. La extensión no sobrepasará las 2.500 palabras incluyendo la bibliografía (no más de 10 citas) y con un máximo de tres figuras/tablas.
— CARTAS AL EDITOR: no deben superar las 1.000 palabras de extensión con un máximo de tres citas bibliográficas. Las cartas deben enfocarse en comentar artículos publicados previamente, o tratar diferentes aspectos de Política Educativa, Sanitaria y Ciencias Farmacéuticas.
— INFORMACIÓN ACADÉMICA: esta sección dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, recensiones de libros, novedades editoriales y otros eventos que la revista considere de interés para los lectores.

B. Organización de los manuscritos

Todos los elementos o partes del manuscrito deben ir a doble espacio, todas las páginas numeradas en la esquina superior derecha empezando en la página de la portada. Los manuscritos referentes a artículos originales deberán

contener, en este orden, los siguientes apartados:

1. PORTADA

Título
Debe ir tanto en español como en inglés. Tendrá una extensión inferior a los 100 caracteres, excluyendo los espacios entre palabras.

Nombre de los autores
El nombre completo de todos los autores y su afiliación institucional. En los trabajos que tengan más de un autor y más de una Institución, indicar la afiliación individual mediante números en superíndices.

Palabras Clave
Cinco palabras clave (en español y en inglés) que no aparezcan en el título.

Información de contacto
Nombre, dirección postal, número de teléfono, fax y dirección de correo electrónico del autor al que se enviarán las galeradas.

Lista de Abreviaturas
Las abreviaturas y su significado deben incluirse en una lista en el mismo orden en el que se mencionan en el artículo.

2. PÁGINA DEL RESUMEN

Incluirá el resumen del artículo en español y en inglés. Deberá escribirse como texto continuo y se organizará del siguiente modo: una pequeña introducción donde se expliquen los antecedentes y los objetivos del trabajo, principales resultados y, finalmente, las conclusiones. Su extensión no debe superar las 250 palabras.

3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

• INTRODUCCIÓN

Exponer información principal y antecedentes del tema que puedan orientar al lector.

• MATERIAL Y MÉTODOS (PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES)

En esta sección se explicarán los métodos experimentales empleados en el trabajo con un nivel de detalle suficiente que permita a otros investigadores repetir el trabajo; para aquellos métodos empleados sin modificaciones significativas respecto al método original, la citación del trabajo original será suficiente.

Experimentación en humanos
En aquellos trabajos de investigación que requieran de seres humanos, se deberá proporcionar: (a) consentimiento por escrito de cada paciente o sujeto sano; (b) el protocolo del estudio conforme con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, reflejado por la aprobación del comité apropiado de revisión de la institución. Se hará referencia a cada paciente mediante números, no mediante iniciales.

Experimentación animal
En los estudios en los que se emplee experimentación animal, se asegurará que todos los animales reciben cuidados humanos de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH publicación 86-23, revisada en 1985).

Fabricantes y proveedores
Incluir los nombres y las localidades (ciudad y estado o país) de los fabricantes y proveedores cuando se mencionen fármacos, instrumentación, aparatos, software, etc.

• RESULTADOS

Se presentarán los principales hallazgos del estudio en forma gráfica cuando sea posible. No ilustrar los pequeños detalles si su información puede ser descrita adecuadamente mediante texto.

- **DISCUSIÓN**

En esta sección se presentarán de forma concisa las implicaciones de los nuevos hallazgos en el campo que corresponda, minimizando la reiteración de los resultados, evitando la repetición de información dada en la introducción, y ajustándose al enfoque y objetivo inicial del trabajo.

- **AGRADECIMIENTOS**

Se incluirán los agradecimientos al personal de apoyo y a proveedores de reactivos especiales. Las becas y ayudas financieras se deberán incluir en esta sección.

- **BIBLIOGRAFÍA**

Las citas bibliográficas tienen que numerarse entre paréntesis en la línea de texto, por ejemplo (7), o (11-13,17), en el orden de citación en el texto. La bibliografía se incluirá al final del artículo. Sólo se podrán citar como artículos «en prensa» a aquellos de los que se incluye una copia de la carta de aceptación en el envío inicial. Las citas deben incluir el título completo del artículo y citarse en el siguiente formato:

Ejemplos de revistas (1) (2) y libros (3) (4):

(1) MACKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett*. 555: 62-65.
(2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; MCARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B.J. y SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in Giardia lamblia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
(3) LANGER, T. y NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. en: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
(4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

- **TABLAS**

Cada tabla debe ir preparada en hoja individual, a doble espacio y numeradas consecutivamente con números arábigos en el orden en el que aparecen en el texto. No duplicar material que ya haya sido presentado en una figura.

- **LEYENDAS DE FIGURA**

Las leyendas deben ir numeradas con números arábigos en el mismo orden en el que aparecen en el texto. El título de la leyenda de la figura no debe aparecer dentro de la propia figura, y debe proporcionarse suficiente información para que la figura sea inteligible sin hacer referencia al texto. Dentro de la leyenda deben ser explicados todas las abreviaturas y símbolos. Las leyendas de figura aparecerán todas de manera consecutiva en hoja aparte.

- **FIGURAS**

La revista solicita un juego completo de figuras. En el reverso de cada figura debe ir marcado en lápiz el número de cada figura, su orientación y el nombre del primer autor.

Blanco y negro
La revista alienta el envío de figuras en blanco y negro. Éstas deben ser impresiones láser de dibujos en blanco y negro y fotografías en brillo de alto contraste de todas las figuras de semitono, por ejemplo, microfotografías, geles, etc.

Color
Proporcionar impresiones en papel brillante donde los símbolos y texto se aprecien claramente frente al fondo de la figura. El Editor y el Comité Editorial seleccionarán las figuras en color que serán publicadas.

Las figuras en color deben tener un alto contraste, sin fondo coloreado y con la posibilidad de aparecer en blanco y negro en la versión impresa de la revista.
Como se indicó previamente, si el envío del manuscrito se realiza vía e-mail, no es necesario mandar el juego completo de figuras impreso en papel.

PERMISOS

Citaciones directas, tablas o ilustraciones tomadas de material protegido por copyright, deben ir acompañadas del permiso escrito del Editor y el autor original para poder ser utilizadas.

REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Todos los manuscritos enviados para publicación serán revisados por dos evaluadores del área de referencia del trabajo. El Editor elegirá los evaluadores más apropiados para cada manuscrito. El manuscrito que requiera más de una revisión o que en el plazo superior a dos meses no sea remitido a la revista desde la decisión editorial inicial, se considerará como un nuevo envío.

La revista no realiza cargos por página. Una vez que el trabajo ha sido publicado, se envían 25 copias impresas del mismo al autor. También se proporcionará la versión en PDF del artículo.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

A. Editorial Policy

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* is a quarterly journal that publishes basic and applied research on pharmaceutical sciences and related areas.

2. A manuscript is accepted for consideration for publication with the understanding that it has not been published elsewhere (except in abstract form), that it is not concurrently under review elsewhere, that its publication has been approved by all the authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and the Publisher.

Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright.

The journal publishes articles written in Spanish or English.

3. An original, a copy, and the electronic version on CD of the manuscript should be sent with a cover letter to:

María Teresa Miras Portugal PhD.
Editor, ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Real Academia Nacional de Farmacia
C/ Farmacia, 11
28004 Madrid
Spain
Fax: 91 531 03 06

To submit the manuscript electronically as an attachment use the E-mail: edicion@ranf.com. The text and the figures should be submitted in separate files. The accepted formats are: .doc (Word) for the text, and TIFF, JPG or PPT (Power Point) for figures.

4. Types of Manuscript.

The journal will consider and publish the following:

— REVIEWS: should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, references, title page but including legends to figures and tables) and the reference list need not be exhaustive (no more than 40). While most reviews are invited by the Editors, authors interested in contributing reviews are requested to first contact the Editor.

— ORIGINAL ARTICLES: should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, title page, and references, but including legends to figures and tables), and include no more than 40 references.

— RAPID COMMUNICATIONS: brief, definitive reports. The manuscript should be identified as such in the cover letter. The length should no longer than 2,500 words including references (no more than 10) and with a maximum of three figures/tables.

— LETTERS TO THE EDITOR: should be no longer than 1,000 words and include no more than three bibliographic references. Letters should focus on commenting or enlarge previous published articles, or deal with some aspects of educational or sanitary policy and pharmaceutical sciences.

— ACADEMIC INFORMATION: this section will inform about different courses, scientific sessions and others events that the journal deem appropriate.

B. Manuscript Organization

All elements of a manuscript should be double-spaced, and all pages must be numbered in the upper right corner, starting with the title page. Manuscripts describing original research should contain, in this order, the following elements:

1. TITLE PAGE

Title
It must be in Spanish and in English. No more than 100 characters, not including spaces between words.

Author Names
The full names of all authors and their institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number.

Keywords
Five keywords (in Spanish and in English) that do not appear in the title itself.

Contact Information
Name, address, telephone number, fax number, and e-mail address for author to whom proofs should be sent.

List of Abbreviations
Include the expansions and list in the order of their mention in the paper.

2. ABSTRACT PAGE

Should contain the summary in both Spanish and English. Write as continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. Do not exceed 250 words.

3. MANUSCRIPT SECTION

- **INTRODUCTION**

  Provide the minimum background information that will orient the general reader.

- **MATERIAL AND METHODS (EXPERIMENTAL PROCEDURES)**

  Provide a level of detail such that another investigator could repeat the work; for methods that are used without significant modification, citation of the original work will suffice.

Human Subjects
For reports of research using human subjects, provide assurance that (a) informed consent in writing was obtained from each patient and (b) the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee. Refer to individual patients by number, not by initials.

Animal Experimentation
In studies involving animal experimentation, provide assurance that all animals received humane care according to the criteria outlined in the «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

Manufacturers
Include the names and locations (city and state or country) of manufacturers when mentioning proprietary drugs, tools, instruments, software, etc.

- **RESULTS**

  Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures.

- **DISCUSSION**

  In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing reiteration of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

• **ACKNOWLEDGMENT**

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Grant and other financial support should be listed in this section.

• **REFERENCES**

These should be numbered in parentheses on the line, e.g. (7), or (11-13,17), in order of citation in the text. The list of references will be printed at the end of the paper. Articles may only be cited as «in press» if a copy of the acceptance notice is supplied at the time of submission. References should include the title of the article and be cited as follows:

Examples of journals (1) (2) and books (3) (4):

(1) MACKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett*. 555: 62-65.
(2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; MCARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B. J. & SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in Giardia lamblia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
(3) LANGER, T. & NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. in: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
(4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• **TABLES**

Prepare tables on individual sheets of paper, double-spaced, and numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance in the text. Do not duplicate material presented in a figure.

• **FIGURE LEGENDS**

Number with Arabic numerals in the order mentioned in the text. Provide a title (this should not appear on the figure itself) and sufficient explanation to render the figure intelligible without reference to the text. Explain all abbreviations and symbols. Type figure legends consecutively on a separate sheet of paper.

• **FIGURES**

The Journal requires *one* set of figures. Mark the back of each figure in pencil with the figure number, its orientation, and the name of the first author.

Black and White

B/W figures are encouraged. Provide clean laser prints of black and white drawings and high-contrast glossy 18-cm-wide photographs of all halftone figures, *e.g.*, photomicrographs, gels, etc.

Colour

Provide glossy prints in which lettering and symbols are clearly visible against the background. The Editor and the Editorial Committee will select the colour figures to be published.
As for the printed figures they should be contrasted, without colour background, and with possibility to appear in black and white in the printed version.
As indicated, if submission is carried out via e-mail, no printed figures are required.

PERMISSIONS

Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author.

PEER REVIEW AND PUBLISHING

The Journal uses anonymous peer review in evaluating manuscripts for publication. The Editor will choose the appropriate reviewers for each manuscript. A manuscript requiring more than a single revision or returned beyond 2 months of the date of the initial decision will be considered a new submission.

There are no page charges. Twenty-five offprints are provided free of charge to the corresponding author of each accepted article. The article in PDF version is also provided.

MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com

CODEN ARAFAY – 72(E)-227/468

ISSN 1697-4271