

El virus de la gripe aviar: nuevos aspectos relativos a su patogenicidad y a estrategias para combatirlo

José Antonio Cabezas Fernández del Campo *

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca.
Recibido el 19 de noviembre de 2008.

RESUMEN

Reconstruido por ingeniería genética el virus que causó la terrible pandemia de gripe de 1918-19 y comprobada su capacidad de infección, se ha deducido que la gran patogenicidad del mismo puede deberse a una desregulación de los mecanismos inmunitarios que ejercen normalmente citocinas de las células hospedadoras.

Asimismo, el subtipo H5N1 del virus de la gripe aviar, por una desregulación análoga, posee una patogenicidad que es aún mayor que la del subtipo de virus de la gripe de 1918-19.

Intentos para prevenir los riesgos (leves, moderados o muy graves) de la esperada pandemia que produciría en humanos el subtipo H5N1 —u otros subtipos peligrosos que puedan surgir— se están efectuando con la preparación de nuevas vacunas, así como mediante la interrupción del ciclo biológico del virus con inhibidores de la enzima vírica neuraminidasa (= sialidasa), tales como el oseltamivir y el zanamivir, o con diversos agentes que bloquean el funcionamiento de otros componentes de dicho virus.

Últimamente, se está analizando si es o no conveniente tratar de reforzar estas medidas con el uso de moduladores de ciertas citoci-

nas, tales como algunas estatinas u otros compuestos de acción e índole varias, cuyo reducido coste —por pertenecer al grupo de los «genéricos»— constituye un aliciente adicional.

Palabras clave: Gripe aviar; Influenza aviar; Patogenicidad; Citoquinas; Estatinas; Gripe 1918-19; Vacunas anti-gripe aviar.

ABSTRACT

Avian influenza virus: new features related to its pathogenicity and strategies for fighting against it

Since Taubenberger's team recreated each of the genes of influenza virus that caused the terrible pandemic of 1918-19 using the technique called reverse genetics and checked the infectious capacity of the newborn virus, it seems that its high pathogenicity may be due to dysregulation of the innate immune mechanisms normally performed by the cytokines of host cell.

Furthermore, the H5N1 subtype of avian influenza, which also causes a similar dysfunction, has higher pathogenicity than that of 1918-19 influenza virus.

Assays to prevent the mild, moderate or severe risks of an eventual future pandemic affecting humans caused by the H5N1 subtype are now being carried out by preparing new vaccines and neuraminidase (= sialidase) inhibitors such as oseltamivir and zanamivir, as well as other agents that block the function of several components of the virus.

Recently, has been debated whether it would be convenient to use modulators of the immune system, such as statins, against the secondary effects of the viral infection caused by the dysregulation mechanisms of cytokines, to reinforce the above therapeutic measures. The low cost of statins offers additional justification for their use.

Key words: Avian flu; Avian influenza virus; Pathogenicity; Cytokines; Statins; 1918-1919 influenza pandemic; «Spanish flu»; Vaccines against avian flu.

1. INTRODUCCIÓN

En relación con el virus de la gripe y los posibles remedios en la lucha contra él, trabajos de investigación y revisiones del autor (publicados en gran parte por esta Real Academia y algunos de ellos resumidos en la página web www.ranf.com de la misma) se han referido a aspectos tales como: la gripe de 1918 (1, 2), la actividad neuraminidásica (= sialidásica) de cepas pertenecientes a los subtipos víricos A y B y la esterásica del subtipo C (2), la situación de la población mundial respecto a esta patología en la primavera de 2006 (3), las características químicas y funcionales de ciertos agentes antigripales (4, 5), y el mecanismo de acción de los inhibidores de la neuraminidasa denominados *zanamivir* y *oseltamivir* (que son los únicos fármacos reconocidos actualmente como útiles para esta lucha) (6). Datos sobre la composición de este virus pueden hallarse en los trabajos de las referencias 1, 4, 5, y 7, especialmente.

Aun cuando el virus de la gripe es, desde hace años, uno de los más investigados, quedan numerosos e importantes aspectos relativos al mismo por esclarecer. Entre ellos los siguientes:

1.º) ¿Por qué fue tan mortífera la pandemia impropia llamada de gripe española (7), ocurrida en 1918-19 (que es como debe denominarse)?

2.º) Dada la similitud entre las características del virus de la gripe de 1918-19 y el de la gripe aviar, según se ha averiguado últimamente, ¿existe en la actualidad peligro de que una futura pandemia de origen aviar pudiera provocar un gran número de muertes entre los humanos?

3.º) ¿Se dispone actualmente de remedios (fármacos preventivos/curativos) para luchar contra este muy probable riesgo?

Seguidamente se resumen algunos datos concernientes a estos puntos, sobre todo los relativos a los años 2006, 2007 y 2008, ya que los de los años precedentes pueden hallarse en las publicaciones indicadas en la bibliografía (1-7).

2. TRANSMISIÓN DE LA GRIPE AVIAR DE ANIMALES A HUMANOS Y ENTRE HUMANOS

Se ha confirmado que esta transmisión entre animales y seres humanos puede tener lugar según las dos modalidades siguientes:

- a) Por reorganización (reagrupación, reagrupamiento) (= *reassortment*) de segmentos de genes procedentes de especies distintas, saltando, por ejemplo, de aves a seres humanos, y adquiriendo la posibilidad de propagarse en éstos.
- b) Por adaptación, mutando el virus aviar, y evolucionando. Así se propagaría entre los humanos.

Lógicamente, cuanto mayor sea el contacto entre aves infectadas y humanos (por hábitos tradicionales de cría y transporte, como ocurre especialmente en el SE asiático, etc.) mayor será el riesgo de contagio.

Análisis del genoma del virus de la gripe aviar H5N1 y de otros subtipos, intensificados a partir del año 2006, que han determinado la secuencia de los genes de los componentes víricos hemaglutinina (HA), sialidasa = neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), polimerasa ácida (PA) y polimerasa básica 2 (PB2) (8), y otros estudios relacionados (9), han señalado la emergencia de variantes (10) o sublinajes (11, 12) de este virus en Asia, sugiriendo que «la transmisión entre pollos es el mecanismo mayor de mantenimiento del endemismo del H5N1 en dicha región» (11), además del provocado por «transmisión a largas distancias por aves migratorias» (11). Añádase a éstas una tercera modalidad de transmisión —aunque de menos importancia que las dos anteriores— representada por el transporte —frecuentemente ilegal— de aves exóticas (no siempre controladas sanitariamente) procedentes de lugares remotos.

En cuanto a la transmisión del subtipo H5N1 de un ser humano a otro, aceptada con dudas inicialmente, parece haberse confirmado en casos como los de la Tabla I, como mínimo.

Las fases del proceso para llegar a producirse una pandemia se estima son las siguientes:

- 1.^a) Virus en las aves migratorias.
- 2.^a) Virus en las aves de corral y granja.

- 3.^a) Virus en personas (por contagio con aves), con posibilidad de contagio persona-persona.
- 4.^a) Virus transmitidos de persona-persona con facilidad, pero en zonas limitadas.
- 5.^a) Virus propagados por diferentes ciudades.
- 6.^a) Virus propagados por todo el mundo.

A la vista de los datos aquí indicados, se deduce que se ha llegado ya a la fase 3.^a de este proceso.

Tabla I. **Transmisión del subtipo H5N1 de humano a humano, con fallecimiento**

Caso n.º	País	Transmisión	Ave	Trat.º	Fallec.º	Referencia
1	Vietnam	Herm.º-herm. ^a	Pato	No	Ambos	Lancet 363: 462 (2004)
2	Tailandia	Madre-hija	Pollos	No	Ambas	N. Eng. 352: 334 (2005)
3	Indonesia	Familiares	Pollos	No	7 de 8	Nature 442: 114 (2006)
4	China	Hijo-padre	Aves merc.º	Sí	Hijo	Lancet 12/04/(2008)
5	Pakistán	Herm. ^a -herm.º	¿?	¿?	¿?	OMS (2008)

3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL SUBTIPO H5N1 DE LA GRIPE

- Este virus fue conocido por primera vez en el año 1959 en pollos en Escocia (Reino Unido), causando sólo leves síntomas de enfermedad en las aves.
- En 1996 ya había mutado, ocasionando la muerte rápida de pollos en el sureste asiático.
- En 1997, además de en pollos, de las 18 personas afectadas por él, seis murieron en Hong Kong.
- De nuevo reapareció en Hong Kong, en 2003; y se extendió por Vietnam y Tailandia.

- Desde entonces, en años sucesivos, se ha detectado en otros países asiáticos, en numerosos países europeos, y, desde 2006, en Nigeria y algunos otros africanos, en número superior a 18 países en total (tanto en aves migratorias como de corral y granja, además de en mamíferos: cerdos, gatos, tigres, leopardos, etc.).
- Particularmente grave para los patos del lago Qinghai (China) fue el brote de la primavera de 2005, que causó la muerte de 6.000 ejemplares (se sospecha que hayan podido influir en este desenlace algunos intentos de domesticación de estos patos silvestres o el contacto de los mismos con otras aves enfermas).

4. FACTORES QUE DETERMINAN PATOGENICIDAD POR EL SUBTIPO H5N1 DEL VIRUS DE LA GRIPE

Hacia 2005 se habían determinado los siguientes factores en relación con:

- **HEMAGLUTININA (HA):** La elevada proporción de aminoácidos básicos (como la arginina y la lisina), que favorecen la actividad de las proteasas celulares. Estas enzimas realizan la escisión de la molécula de la hemaglutinina, siendo dicha etapa indispensable para la fusión del virus con la membrana de la célula hospedadora y la penetración de aquél en la célula.
- **NEURAMINIDASA (NA) = SIALIDASA:** Cambios estructurales en esta glicoproteína, ocasionados por la pérdida de una veintena de aminoácidos de la misma (por delección).
- **PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL (NS):** Delección en alguno de sus genes.
- **POLIMERASA BÁSICA 2 (PB2):** Peculiaridades correspondientes al gen de este componente del virus.

5. RELACIÓN DE CIERTOS COMPONENTES DEL VIRUS DE LA GRIPE DE 1918-19 Y LA AVIAR CON SU RESPECTIVA PATOGENICIDAD

La reciente reconstrucción completa, mediante ingeniería genética, del virus causante de la pandemia de 1918-19 ha permitido deducir que la MUTACIÓN en el complejo de la POLIMERASA es uno de los cambios genéticos que originaron dicha pandemia (13).

A su vez, la «PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL NS1 puede ser muy importante para la virulencia de los virus de gripe aviar cuando éstos son introducidos en los seres humanos» (14). Y se ha confirmado: «La PROTEÍNA NS1 del virus A de la gripe es un factor importante de virulencia que es esencial para la patogénesis» (15).

Ahora bien, «la virulencia del virus de la gripe es una característica multigénica. Un determinante de la virulencia es la PROTEÍNA multifuncional NS1, la cual funciona de diversos modos para vencer la respuesta celular inmune (16) (véase más adelante el importante aspecto de la inmunidad alterada).

Pero «los genes de la HEMAGLUTININA, de la NEURAMINIDASA y de la POLIMERASA [...] también contribuyen a la virulencia» (17).

Últimamente se ha señalado que la PROTEÍNA «PB1-F2 del virus de la gripe de 1918 aumenta la patogénesis de la neumonía viral y bacteriana secundarias» (actualmente se conoce que esta neumonía tuvo gran importancia en la enorme mortalidad de aquella pandemia) (18).

De todo ello es responsable una mutación que determina la sustitución de un aminoácido en la PB1-F2 del virus H5N1 (19).

Recientemente se ha confirmado el papel crítico de la PB1, la HEMAGLUTININA y la NEURAMINIDASA en la alta virulencia del virus de la pandemia de gripe de 1918.

Por otro lado, la decisiva influencia de la PROTEÍNA de membrana M2 del virus de la gripe tipo A en la activación de su HEMAGLUTININA (al actuar como conducto de protones para la función de la hemaglutinina) ha sido últimamente revisada y comprobada (21, 22).

Asimismo, se estima que «el estudio de la virulencia del virus de la gripe de 1918 requiere el uso del virus completamente reconstruido», no sólo el de algunos de sus componentes (23).

6. RESPUESTA INMUNE ABERRANTE: CITOCINAS

Recuérdese que las citocinas —inicialmente llamadas interleucinas (IL) al creerse que su producción era exclusiva de los leucocitos— son proteínas o glicoproteínas, de muy diversa composición y generalmente de bajo tamaño molecular, dotadas de gran complejidad en su función, que median y regulan la respuesta inmune (entre otras importantes actividades), produciendo efectos en ocasiones aditivos, o sinérgicos, o incluso antagónicos si actúan simultáneamente varias de ellas.

Para los fines del presente estudio, hay que destacar las actividades de la interleucina 1 α (IL-1 α) y la IL-6 (producidas por macrófagos), así como la del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que son agentes implicados en la respuesta inflamatoria. La producción de IL-1 α e IL-6 es inhibida por la IL-4, la IL-10 y los glucocorticoides. El TNF- α , a concentraciones elevadas, al inducir prostaglandina I₂, puede ocasionar efectos mortales, por provocar hipotensión y favorecer la trombosis.

Las quimiocinas estimulan la migración de leucocitos hacia el sitio de la inflamación.

Los interferones, como el de tipo 1 (que son también citocinas) aumentan la variedad de mecanismos inmunes vinculados con las relaciones virus-hospedador.

Otra familia de compuestos con funciones relacionadas con los procesos de inflamación (además de otras) es la de los eicosanoides, derivados del ácido araquidónico. A ella pertenecen los tromboxanos, los leucotrienos, las lipoxinas y las mencionadas prostaglandinas. Éstas pueden estimular la inflamación, siendo bloqueadas por la aspirina (que actúa inhibiendo la ciclo-oxigenasa).

«Ahondando más profundamente en el misterio de la gripe de 1918, [se ha deducido que] el mayor daño puede no haber sido

hecho por el virus mismo, sino por un sistema inmune excesivamente reactivo» (24).

Se ha señalado en 2007 que el virus de la gripe de 1918 produce en macacos una respuesta inmune aberrante, a causa de la infección letal. «La capacidad de los virus de la gripe para modular las respuestas inmunes del hospedador, como la demostrada para los virus de influenza aviar H5N1, puede ser un aspecto compartido por los virus de la gripe virulentos» (25).

«H5N1 y el virus de 1918 comparten una proclividad por los pulmones, pero el H5N1 no se detiene ahí. [...] Lo que se inicia como una infección respiratoria puede llegar a ser una infección de todo el cuerpo. Los investigadores se han sorprendido al hallar que el virus de 1918, con toda su furia, no mutó para destruir otros órganos. Esto hace pensar que el H5N1 puede ser 10 veces más letal que el virus que ocasionó la mayor tragedia de la historia de la Humanidad» (26).

«Si una pandemia como la de 1918 ocurriera hoy —[se escribió en el año 2006]—, mataría a 175-350 millones de personas en el mundo. [...] Podemos estar seguros de que [una pandemia leve, moderada o grave] ocurrirá, tardando más o menos» (27).

«Experimentos de laboratorio sugieren que la desregulación por citocinas inducida por el virus puede contribuir a la gravedad de la enfermedad» (28). Estudios hechos con 18 personas infectadas con virus H5N1 mostraron altos niveles sanguíneos de citocinas y quimiocinas. Asimismo, «la elevada carga vírica y la intensa respuesta inflamatoria son de la mayor importancia para la patogénesis de la gripe por H5N1» (28).

Por otro lado, considerando que las citocinas «participan en la patogénesis y en las complicaciones neurológicas asociadas con la gripe», se determinaron en 27 niños con infección comprobada de gripe y que mostraban complicaciones neurológicas (algunos con delirio, etc.) los niveles séricos de las citocinas IL-6 y TNF- α . Se averiguó que ambos (y algunos otros) valores se hallaban incrementados respecto a los normales (29).

Los trabajos de las referencias 25-29 (entre otros) han venido a confirmar lo considerado sólo como hipótesis todavía en el año 2002 (30), aunque ésta ya fuera respaldada en 2004 (31), acerca del

importante papel ejercido por el virus H5N1 desregulando el mecanismo de acción de las citocinas y ocasionando así una grave patogenicidad.

Frente al riesgo de una futura pandemia de gripe, es imprescindible, entre otras medidas (3), contar con técnicas para un diagnóstico rápido y seguro relativo a las características del virus, para su tipificación precisa (6), así como disponer de agentes antivirales (oseltamivir, zanamivir). La composición, mecanismo de acción y posología de éstos han sido descritos detalladamente (6).

Acerca de vacunas destinadas a prevenir tal pandemia, se han producido avances muy notables, especialmente a partir del año 2006, según se resume a continuación, no sólo utilizando las técnicas tradicionales, que han servido de base para algunas modalidades, sino también estrategias novedosas.



La pandemia de la gripe de 1918-19 (injustamente denominada por algunos «gripe española») causó la muerte de probablemente más de 50 millones de personas, provocando escenas de pánico que recuerdan a las que evocó BRUEGHEL en su famoso cuadro titulado *El triunfo de la muerte*, pintado hacia 1560 (que se custodia en el madrileño Museo del Prado), al reflejar escenas correspondientes a la terrible epidemia de peste del año 1348. «Killed 50 million people - and it could happen again» (Nature / Vol. 429 / 27 May 2004).

7. FABRICACIÓN DE VACUNAS CONTRA LA GRIPE. Por:

— **Técnicas *tradicionales*:**

- Con virus atenuados (debilitados por pases a temperaturas bajas).
- Con virus atenuados (de escaso poder patógeno y de rápido crecimiento), mezclados con otros conteniendo los antígenos de cepas más recientes, lográndose así un reagrupamiento adecuado de genes.
- Con virus inactivados, mediante formaldehído o propionlactona, y sometidos a tratamiento de extracción de sus lípidos de la envoltura por eter, cloroformo, detergentes, etc., lo que ocasiona su *fragmentación o fraccionamiento*.

— **Técnicas *relacionadas con la Biología Molecular*:**

- Por manipulación genética (genética inversa o reversión génica), que consiste esencialmente en convertir el genoma vírico de ARN en ADN, y manipularlo para eliminar los genes que se consideran causantes de la patogenicidad; después se reconvierte al ADN en ARN, para la producción de la vacuna.
- Por clonación de los genes responsables de la producción de antígenos (introducidos mediante un microorganismo como vector): vacunas recombinantes.
- Vacunas de ADN «desnudo»: Inoculando en las células del receptor los genes que determinan que se exprese el antígeno deseado.

— **Técnicas *por síntesis química*** (generalmente de los péptidos que producen la respuesta inmune).

8. PREPARACIÓN DE DISTINTAS CLASES DE VACUNAS Y OTRAS ESTRATEGIAS CONTRA EL SUBTIPO DE VIRUS DE GRIPE H5N1

Título (abreviado) del trabajo	Características de la vacuna	Referencia
(...) Non-adjuvanted & adjuvanted vaccine against H5N1 influenza		<i>Lancet.</i> 57:1937, 01
(...) Reverse genetics for rapid development of influenza vaccines	Puede producirse en 4 semanas	<i>Lancet.</i> 363:1099, 04
(...) Reverse genetics for influenza A virus vaccine production	Usa un solo plásmido	<i>PNAS.</i> 46:1825, 05
(...) Adeno-viral-vector-based pandemic influenza vaccine (...)	Respuesta humoral y celular	<i>Lancet.</i> 367:475, 06
(...) Inactivated Subvirion (...) H5N1 Vaccine	Virus crecidos en huevos	<i>N. Engl. J. Med.</i> 354:1343, 06
Flu-vaccine makers toil boost supply	Países que inician producción	<i>Nature.</i> 440:1099, 06
(...) An inactivated split-virion (...) (H5N1) vaccine: phase I trial		<i>Lancet.</i> 367:1657, 06
(...) An inactivated adjuvanted whole-virion (...) H5N1 vaccine		<i>Lancet.</i> 368:991, 06
Vaccines developed for H5N1 highly pathogenic (...) in China	Es una vacuna H5N2 inactivada	<i>Ann. N. Y. Ac. Sci.</i> 1081, 06
Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin (...)	Vacuna bivalente contra NDV y gripe	<i>PNAS.</i> 103:8197, 06
Engineered viral vaccine (against) avian influenza and New. Dis		<i>PNAS.</i> 103:8203, 06

Título (abreviado) del trabajo	Características de la vacuna	Referencia
Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine (...) H5N1		<i>J. Virol.</i> 81:150, 07
Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with Al adjuv		<i>Vaccine.</i> 25:3554, 07
Nucleic acid-based antiviral drugs against (...) influenza viruses	Oligonucleótidos, dsRNA	<i>Vaccine.</i> 25:3175, 07
Virus-like particle vaccine (...) against (...) influenza viruses	Contiene NA y prot. M1	<i>J. Virol.</i> 81:3514, 07
Virus-epitope vaccine design: informatic matching (...)		<i>Mol. Immunol.</i> 44:1253, 07
Influenza vaccines: The challenge of antigenic drift	Vacuna universal, conteniendo la prot. M2 y NP	<i>Vaccine.</i> 25:6852, 07
Flu virus Research (...) but No Magic Bullet		<i>Scient. Med.</i> 319:1178, 08
Beating the Flu in Single Shot	Prot. M2e + prot HBc → cel. Infectada	<i>Scient. Am.</i> (08/2008)
GSK bird flu vaccine	La comisión europea ha aprobado la vacuna «Prepandrix» (de Glaxo SmithKline). Novartis lo intenta con «Aflunov». Ambas contra el H5N1	<i>Nature Biotech.</i> 26:846, 08
For an H5N1 influenza vaccine	«Vacunas de virus enteros inactivados son superiores a las de fragmentos o subunidades víricas»	<i>PloS Pathog.</i> 4: e1000138 (09/2008)

Otras estrategias aún en estudio frente al H5N1

ARN interferente. *RANF*, Monografía XXI, 187, **06**.

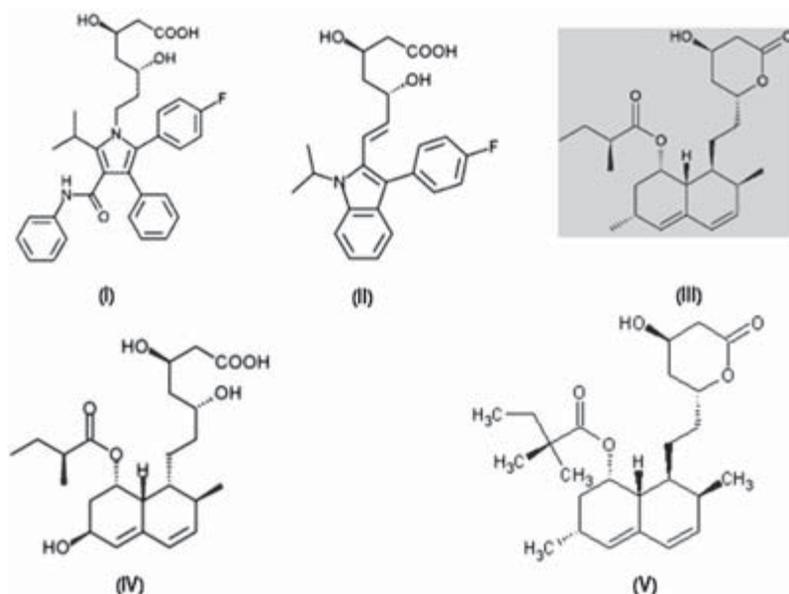
IFN-stimulated gene
15 functions as a critical
antiviral molecule against
influenza (...).
PNAS 104: 1371, **07**.

Cytotoxic therapy for severe
avian influenza
A (H5N1) infection.
Lancet 367:870, **07**.

[...] Supresión of a host
antiviral response
by influenza A Virus.
PNAS 105: 13093, **08**.

9. OTROS POTENCIALES AGENTES ANTIGRIPALES

Recuérdese que las ESTATINAS actualmente autorizadas para uso terapéutico [atorvastatina (I), fluvastatina (II), lovastatina (III),



pravastatina (IV) y simvastatina (V)] son compuestos cíclicos, que funcionan como inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-hidrolasa (EC. 3.1.2.5), que cataliza una de las primeras etapas de la biosíntesis del colesterol en el hígado.

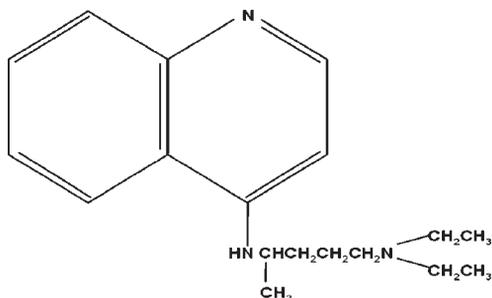
Aquí, interesa sólo destacar que, entre otras importantes funciones —como la de evitar el incremento excesivo de los niveles sanguíneos de las LDL (= colesterol «malo»)—, ejercen un efecto anti-inflamatorio al actuar modulando la acción de las citocinas proinflamatorias, además de disminuir la adhesión de los leucocitos, etc. Concretamente, la atorvastatina favorece la liberación de las interleucinas 4, 5 y 10.

También, por mecanismo tal vez distinto al de la hidrolasa antes indicada —por tanto, de tipo no hipolipolemiante—, ejercen un efecto antiviral, que se utiliza para combatir el virus de la hepatitis C. En consecuencia, recientemente se ha propuesto el uso de estatinas como agentes antigripales, sugiriéndose que quizá, al interferir la biosíntesis del colesterol componente de la membrana de la célula hospedadora (donde se fija el virus para su penetración y luego su liberación), o por otro mecanismo, bloquearían el ciclo biológico de dicho virus.

A los agentes de lucha contra la gripe que causa el virus H5N1 actualmente autorizados (vacunas, oseltamivir, zanamivir) se intenta añadir otros como las estatinas, que tienden a paliar los graves efectos inflamatorios y cardiovasculares subsiguientes, ocasionados por la desregulación de las citocinas, aun cuando el/los mecanismo/s mediante los cuales «las estatinas ejercen sus efectos beneficiosos en pacientes con bacteriemia y sepsis no son bien conocidos» (27). En realidad, su eventual empleo en la profilaxis y tratamiento en relación con el riesgo de una pandemia de gripe era (en el año 2006) sólo una hipótesis (27).

En el año 2007, en el estudio realizado usando ratones infectados con virus H2N2 y tratados con «gemfibrozil», fármaco empleado para rebajar la trigliceridemia, se ha observado que se inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias al actuar aquél como ligando sintético vinculado a la acción de los peroxisomas (32).

Distinto es el mecanismo según el cual actúa la cloroquina, compuesto que ha sido asimismo propuesto para complementar los efectos beneficiosos atribuidos a estatinas y «gemfibrozil»:



«La cloroquina se acumula en el endosoma, donde interfiere la acidificación, y por ello daña la fusión del virus» [con la célula hospedadora] (33).

Por otro lado, así como los intentos de usar «corticosteroides para controlar la inflamación excesiva estuvieron asociados a efectos secundarios sin mejoría en la pervivencia», un tratamiento inmunomodulador con una combinación de zanamivir (inhibidor de la neuraminidasa vírica) y de los bloqueadores de la inflamación «celecoxib» (COX-2, inhibidor de la ciclo-oxigenasa-2) y «mesalazine» (que contribuye a disminuir los niveles sanguíneos de citocinas y eicosanoides proinflamatorios) «incrementa la pervivencia de ratones infectados con una cepa altamente patogénica de virus de gripe A/H5N1» (34).

Independientemente de la eventual utilidad terapéutica de estos agentes del grupo de los moduladores de citocinas, que se estima suprimen o aminoran los efectos perjudiciales para los pacientes (ocasionados por la desregulación de éstas en casos de infección por H5N1), la opinión ya antes expresada por numerosos especialistas y reiterada por D. S. Fedson en 2008 (27, 33) advierte que sería prácticamente imposible disponer oportunamente de cantidades suficientes de vacunas y/o oseltamivir/zanamivir en todo el mundo en el caso de producirse la esperada pandemia que causaría este virus. Sólo los países productores de vacunas y de los mencionados inhibidores de neuraminidasa se hallarían en una situación menos peligrosa.

Asimismo, el elevado coste de todos estos agentes, inasequible para los países pobres, además de la inevitable tardanza en la preparación de las vacunas, constituye otra barrera en cuanto a su empleo.

Por el contrario, el reducido coste de los moduladores de citocinas, por ser «genéricos» de fabricación económica —el tratamiento de cinco días con simvatatina costaría unos 2 \$, mientras que el de oseltamivir sería de 560-590 \$ (27)—, considera Fedson que contribuiría a mitigar, al menos, los temidos efectos perjudiciales de dicha esperada pandemia.

No obstante, R. Salomón *et al.* (35) consideran que los resultados de las investigaciones por ellos realizadas «refutan el paradigma popular de que la denominada «tormenta por citocinas» —[*cytokine storm*]

— es la causa de la muerte debida a la infección por H5N1». Y añaden: «La inhibición temprana de la replicación vírica es más prometedora que la inhibición de la respuesta por citocinas para promover la supervivencia del hospedador en la infección por virus de la gripe H5N1».

Ahora bien, Fedson (33) replica a esta opinión estimando que los experimentos de Salomón y colaboradores fueron «hechos con número pequeño de ratones» como para poder concluir que los «agentes anti-inflamatorios e inmunomoduladores sean o no beneficiosos en el tratamiento de infecciones por H5N1 en ratones o humanos».

Obsérvese que, en cualquier caso, ambas posibilidades no parece que sean totalmente contrapuestas, sino que hasta quizá podrían resultar complementarias.

10. SITUACIÓN ACTUAL

Probablemente, «éste es el estado actual de la cuestión». Otros trabajos —si hay tiempo y medios suficientes para realizarlos— deberán contribuir a que en un futuro no lejano se disponga de una información más completa, tal vez definitiva, y verosímilmente más esperanzadora que la ahora existente.

Las medidas preventivas puestas en práctica en Europa, ya desde años atrás, han podido influir favorablemente —además de otros factores, como tal vez el cambio climático, que ha modificado rutas y épocas de migraciones aviarias— haciendo que el número de casos reconocidos de propagación por el H5N1 haya sido escaso últimamente.

No obstante, desde 2006 (véase hasta esa fecha la publicación de la referencia 3), se han registrado oficialmente, al menos: Un brote en el Estado de Brandemburgo (Alemania), en diciembre de 2007; un caso en aves en libertad, en el Reino Unido, en febrero de 2008; y ha sido necesario sacrificar 1.400 aves (ocas, patos, pollos y pavos) en una granja alemana, cercana a la localidad de Görlitz y a la frontera con Polonia, en octubre de 2008, en evitación de riesgos, para prevenir el contagio por un pato.

En cuanto al número de personas que hubieran fallecido en el mundo víctimas de este subtipo, la OMS lo calculaba, hasta agosto de 2008, en no menos de 245.

Todo ello confirma que el peligro para los humanos subsiste.

El artículo editorial de la revista *Nature*, de 10-07-2008, titulado: «*The long war against flu*» (= La larga guerra contra la gripe), comienza así: «El hecho de que la cepa H5N1 no haya aún causado una pandemia no debe ser motivo de complacencia. Preparativos para lo inevitable deben ser redoblados para mitigar la potencial devastación» (36). Y, unas páginas más adelante, en otro trabajo se hace la siguiente pregunta (que reitera dudas anteriores): *Ready for avian flu?* (= ¿Preparados para la gripe aviar?) (37). En él, una vez más se recomienda coordinar esfuerzos y las reservas de fármacos en beneficio de todos. Pero no aparece de modo categórico una contestación a la delicada pregunta planteada...

Cabe pensar, ¿se habrán aprovechado debidamente las «lecciones sobre el virus de 1918 acerca del origen de las pandemias de gripe», según se solicitaba ya en 2005, poco después de la «reconstrucción» de dicha cepa de virus? (38).

El porvenir no parece muy tranquilizador cuando en agosto de 2008 se vuelve a recordar —nada menos que en la revista *Nature Biotechnology* (39)— que, además del riesgo por el temido H5N1, «no conocemos si la próxima pandemia será por el virus H5N1, el H2, el H7 o el H9».

11. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Al Académico Profesor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, por haber facilitado publicaciones acerca de fármacos anti-inflamatorios.

A doña Beatriz Cabezas y a don Javier Ibáñez, por su indicación de datos sobre estatinas.

A don Manuel Tirado Juárez, de esta Real Academia, por la transcripción del texto.

El autor desea dedicar este trabajo, como sencillo homenaje póstumo, al muy apreciado colega Académico, Excmo. Señor don Juan Manuel Reol Tejada, quien siempre mostró especial interés por el tema aquí tratado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabezas, J. A. (1990) Datos sobre las pandemias de la gripe de 1889-90 y 1918-19 en Madrid y Salamanca, y estudios sobre la sialidasa (...). *Discurso de recepción como Académico de Número, R. Acad. Nac. Farm.* Madrid.
2. Cabezas, J. A. (1991) Études sur la sialidase et l'esterase des virus de la grippe. *Discurso de incorporación como Académico Correspondiente en l'Académie Nationale de Pharmacie*, Paris.
3. Cabezas, J. A. (2006) Gripe aviar: Situación actual. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72: 301-315.
4. Cabezas, J. A. & Hannoun, C. (1990) La gripe y sus virus. *Inv. Ciencia.* 159: 62-69.
5. Cabezas, J. A. (2004) Datos actuales sobre virus de la gripe de patos salvajes y pollos, y virus de la gripe tipo C. *Monografía conjunta de las R. Acad. Nac. de Medicina y Farmacia.*
6. Cabezas, J. A. (2006) Inhibidores de la neuraminidasa (...). *R. Acad. Nac. Farm. Monografía XXI*, 187-239.
7. Cabezas, J. A. (2005) Nuevos datos acerca del virus causante de la pandemia de gripe de 1918-19 y su relación con los de la gripe aviar. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 71: 83-110.
8. Ahn, I. [...], Jung, J., Son, H. S. (2006) Genomic Analysis of Influenza A Viruses, including Avian Flu (H5N1) Strains. *Eur. J. Epidemiol.* 21: 511-519.
9. Ubenauer, J. C., Denson, J. [...] & Naeve, C. W. (2006) Large-Scale Analysis of Avian Influenza Isolates. *Science.* 311: 1576-1580.
10. Smith, G. F. D. [...] Webster, R. G. & Guan, Y. (2006) Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 16936-16941.

11. Chen, H. [...] Peiris, J. S. M. & Guan, Y. (2006) Establishment of multiple sublinages of H5N1 influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 2845-2850.
12. Rambaut, A. [...] Taubenberger, J. K. & Holmes, E. C. (2008) The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature.* 453: 615-619.
13. Butler, D. (2006) Alarms ring over bird flu mutations. *Nature.* 439: 248-249.
14. Normile, D. (2006) Genomic Analysis Hints at H5N1 Pathogenicity. *Science.* 311: 457.
15. Satterly, N. [...] Levy, D. E. & Fontoura, B. M. A. (2007) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 1853-1858.
16. Jackson, D. [...] Pérez, D. R. & Lamb, R. A. (2008) A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4381-4386.
17. Grimm, D. [...] García-Sastre, A. [...] & Kochs, G. (2007) Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional MX1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 6806-6811.
18. McAuley, J. L., Hornung, F. [...] & McCullers, J. A. (2007) Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia. *Cell Host & Microbe.* 2: 240-249.
19. Conenello, G. M. [...] Tumpey, T. & Palese, P. (2007) Single Mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 Influenza A Viruses Contributes to Increased Virulence. *PLoS Pathogens.* 25-10-2007.
20. Papas, C. [...] García-Sastre, A. [...] & Tumpey, T. M. (2008) Single gene reassortant identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 3064-3069.
21. Schnell, J. R. & Chou, J. J. (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature.* 451: 591-595.
22. Stouffer, A. L. [...] Stayrook, S. & Degrado, W. F. (2008) Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature.* 451: 596-599.
23. Kash, J. C. [...] Taubenberger, J. K., & García-Sastre, A. (2006) Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature.* 443: 578-581.
24. Enserink, M. (2007) Digging Deeper Into the 1918 Flu Mystery. *Science.* 29-09-2007.
25. Kobasa, D. [...] Feldman, H. & Kawaoka, Y. (2007) Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature.* 445: 319-323.
26. Greger, M. (2006) Bird Flu. Lantern Books. New York, p. 57.
27. Fedson, D. S. (2006) Pandemic influenza: A Potential Role for Statins in Treatment and Profilaxis. *Clin. Infect. Dis.* 43: 199-205.
28. Jong, M. N. [...] Hien, T. T. & Farrar, J. (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Medic.* 12: 1203-1207.

29. Fukhmoto, Y., Okumura, A. [...] & Morishima, T. (2007) Serum levels of cytokines and EEG findings in children with influenza associated with mild neurological complications. *Brain & Develop.* 29: 425-430.
30. Cheung, C. Y. [...] Guan, Y. & Peiris, J. S. (2002) Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease. *Lancet.* 360: 1831-1837.
31. Peiris, J. S. [...] Yuen, K. Y. & Guan, Y. (2004) Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet.* 363: 617-619.
32. Budd, A. [...] Wood, J. & Clark, J. (2007) Increased Survival after Gemfibrozil Treatment of Severe Mouse Influenza. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 51: 2965-2968.
33. Fedson, D. S. Confronting an influenza pandemic with inexpensive generic agents: can it be done? *Lancet.* 16-04-2008.
34. Zheng, B.-J. [...] Jin, D.-Y. & Yuen, K.-Y. (2008) Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 8091-8096.
35. Salomon, R., Hoffmann, E. & Webster, R. G. (2007) Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 12479-12481.
36. [Editorial]. The long war against flu. *Nature.* 454: 137 (2008).
37. Yamada, T., Dautry, A. & Walport, M. (2008) Ready for avian flu? *Nature.* 454: 162.
38. Belshe, M. D. (2005) The origins of Pandemic Influenza-Lessons from the 1918 Virus. *N. Engl. J. Med.* 353: 2209-2211.
39. Aldridge, S. (2008) GSK bird flu vaccine. *Nature Biotechnol.* 26: 846.

OTRAS REFERENCIAS

SOBRE ARTÍCULOS RELACIONADOS CON EL PRESENTE TRABAJO (APARECIDOS CON POSTERIORIDAD A LA REDACCIÓN DEL MISMO) QUE HAN SIDO INCORPORADAS DURANTE LA REVISIÓN DE LAS PRUEBAS DE IMPRENTA DE ÉSTE

- Das, K. [...], Krug, R. M. & Montelione, G. T. (2008) Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 13093-13098.
- Yu, X. [...], Tumpey, T. M. [...] & Crowe, J. E. (2008) Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 455: 532-535.
- Bornholdt, Z. A., Prasad, B. V. V. (2008) X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Nature* 0744/doi: 10.1038.
- Russell, R. [...], Gamblin, S. J. & Skehel, J. J. (2008) Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 17736-17741.

- Modis, Y. (2008) How influenza virus is locked out of the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 18647-18648.
- Yen, H.-L. [...], Bus, D. [...] & Webster, R. G. (2009) Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin binding domain affect systemic spread. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 286-291.
- Dias, A. [...], Cusack, S. & Ruigrock, R. W. (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 07745/ doi: 10.1038.

* **Información de contacto:**

Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Paseo Carmelitas, 43. Salamanca (España).

Inflamación neurogénica: mecanismos y oportunidades dermocosmécéticas

Antonio Ferrer Montiel*

Instituto de Biología Molecular y Celular.
Universidad Miguel Hernández. Elche.
Recibido el 17 de febrero de 2009.

RESUMEN

La inflamación neurogénica cutánea está surgiendo como la causa de diversas condiciones de la piel, así como de patologías dermatológicas. El íntimo contacto y comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso periférico es fundamental para la biología y fisiología de la piel. Un desequilibrio o disfunción en esta relación resulta en el establecimiento de un estado inflamatorio que es reforzado por la sinergia y complementariedad de ambos sistemas celulares. Cada vez hay más evidencia señalando al termorreceptor TRPV1 como un actor clave en el establecimiento y mantenimiento de la inflamación neurogénica. Este receptor es activado por estímulos físicos y químicos, y su actividad de canal iónico es notablemente incrementada por la acción de agentes pro-inflamatorios como las neurotrofinas, las interleucinas, las cininas y el ATP. Un incremento de la actividad de TRPV1 resulta en un aumento de la excitabilidad neuronal que, a su vez, se traduce en la liberación de los neuropéptidos Sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (α -CGRP) que estimulan el sistema inmune, provocando la liberación de más factores pro-algésicos. Por tanto, el receptor TRPV1 está siendo considerado como una diana dermatológica y cosmética, y compuestos que reduzcan su actividad serán dermocosmécéticos útiles para el tratamiento de diversas condiciones cutáneas.

Palabras clave: Epidermis; Sistema inmune; Nociceptor; Sensibilización; Canales TRP.

ABSTRACT

Neurogenic inflammation: mechanisms and dermocosmeceutic opportunities

Cutaneous neurogenic inflammation is emerging as the cause of diverse skin conditions, as well as dermatological diseases. The intimate interplay between the dermal immune system and the peripheral nervous system is central for the biology and physiology of the skin. A dysfunction in this interaction gives rise to an inflammatory state that is strengthened by the complementarity of both cellular systems. Cumulative evidence is signalling to TRPV1 as a key player in the onset and maintenance of neurogenic inflammation. This thermoreceptor is activated by physical and chemical stimuli, and its ion channel activity is notably enhanced by pro-inflammatory mediators such as neurotrophins, interleukin, kinins and ATP. An increment of TRPV1 activity results in an augment of neuronal excitability which, in turn, induces the release of substance P (SP) and α -calcitonin gen-related peptide (α -CGRP) that paracrinally act and stimulate peripheral immune cells provoking the release of additional pro-algesic agents. Therefore, TRPV1 receptor is being considered as a dermatological and cosmeceutical target and compounds that reduce its activity will be useful dermocosmetics for the treatment of several cutaneous conditions.

Key Words: Epidermis; Immune system; Nociceptor; Sensitization; TRP channels.

INTRODUCCIÓN

Un concepto emergente en la biología de la piel es el control neuronal de la fisiología cutánea (1). La piel no es simplemente una capa dérmica de células cubierta por una envoltura epidérmica de queratinocitos senescentes. Hay evidencia que indica que el sistema

nervioso periférico juega un papel crítico en la fisiopatología de la piel (1). En este sentido, es bien conocido que la piel posee la innervación más compleja e intensa de todos los órganos en mamíferos, que permite elaborar una respuesta tanto a señales procedentes del medio ambiente (temperatura, radiación, presión) como a factores internos (circulación, emoción y estrés). Los nervios cutáneos consisten en fibras aferentes sensoriales que transmiten señales desde la piel al sistema nervioso central, y de fibras nerviosas eferentes o simpáticas que controlan las funciones ecrinas, el flujo sanguíneo y la erección del vello. Estos nervios están cargados de una plétora de neuropéptidos y neurotransmisores que, tras su liberación por un estímulo químico o físico, influyen en una gran variedad de funciones fisiológicas (vasodilatación, diferenciación, secreción, y temperatura corporal) y patológicas (inflamación, proliferación, respuesta inmune y cicatrización) en la piel (1).

El sistema nervioso periférico y el sistema inmune están en continua e íntima comunicación en la piel, tanto a nivel morfológico como a través de distintos mediadores químicos (1, 2). En condiciones normales, las neuronas sensoriales primarias son silenciosas. Sin embargo, tras un daño tisular, el ATP y la acidosis producida por las células lesionadas, junto con las citocinas liberadas por las células inmunes estimulan a los nociceptores que, a su vez, secretan neuropéptidos que activan cascadas de señalización inflamatorias, edema y dolor. Además, la estimulación antidrómica de los nociceptores contribuye adicionalmente a incrementar la liberación de neuropéptidos que sinérgicamente contribuyen a propagar la respuesta inflamatoria. Los agentes neuronales que inician y propagan el proceso inflamatorio son los péptidos bioactivos SP y α -CGRP liberados periféricamente tras la estimulación nociceptiva de las neuronas sensoriales y las células endocrinas en todos los órganos. Estos neuropéptidos actúan autocrinamente en las terminales nociceptoras y paracrinamente en células cercanas como los mastocitos, células del sistema inmune y el músculo liso vascular produciendo la inflamación del tejido (2, 3). La hiperactivación de las neuronas sensoriales produce vasodilatación, extravasación plasmática e hipersensibilidad (también conocida como excitabilidad neuronal de segundo orden). Los síntomas inflamatorios que resultan de la activación y sensibilización de las neuronas sensoriales primarias son conocidos como inflamación neurogénica. Varios

estudios sugieren a la inflamación neurogénica como la causa de diversas enfermedades inflamatorias como la rinitis alérgica, asma, dermatitis, vulvodinia, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y migraña (3). Consecuentemente, el control de la excitabilidad neuronal periférica puede tener un impacto terapéutico importante en el tratamiento de estas patologías. Sin embargo, no hay que olvidarse del también importante papel que juega el sistema inmune, cerrando el circuito retroalimentativo característico de la inflamación neurogénica.

EL SISTEMA INMUNE DE LA PIEL

El concepto o existencia del sistema inmune dérmico fue introducido para englobar todos los componentes celulares y humorales implicados en las reacciones inmunes cutáneas in humanos, permitiendo la subdivisión en elementos inmunes innatos y adquiridos (1). Los constituyentes celulares del sistema inmune dérmico incluye a los queratinocitos, las células dendríticas, las células de Langerhans, los monocitos, los macrófagos, los granulocitos, los mastocitos, las células epiteliales linfáticas y vasculares y los linfocitos T. Los queratinocitos, que juegan un papel central en el mantenimiento estructural y de la integridad de la epidermis, también sintetizan, expresan y liberan una importante variedad de citocinas en la piel. Las células de Langerhans tienen su origen en la médula ósea, de donde migran por el torrente sanguíneo a la dermis y la epidermis. Su labor principal es la de reconocer antígenos y migrar desde la epidermis al nódulo linfático regional donde actúan de células presentadoras de antígeno capaces de activar células T (1, 2). Las células T activadas viajan de vuelta a la zona inflamada en la piel, pudiendo provocar respuestas tipo Th1 o Th2. Un gran número de moléculas en las células de Langerhans participan en la respuesta inflamatoria. Estas células producen una respuesta humoral que incluye la liberación de defensinas, catelicidinas, inmunoglobulinas, citocinas, quimocinas, radicales libres (como el óxido nítrico) y neuropéptidos; así como la activación del complemento (2, 3). Estos compuestos pueden estimular tanto el sistema inmune como el sistema nervioso periférico, contribuyendo al inicio, establecimiento y expansión de la respuesta inflamatoria.

EL SISTEMA NERVIOSO DÉRMICO

En la piel, las fibras nerviosas son principalmente sensoriales, complementadas con nervios autonómicos (1). Las neuronas sensoriales pueden clasificarse de acuerdo con sus propiedades fisiológicas en cuatro grupos principales: i) Fibras $A\alpha$, compuestas de neuronas de tamaño grande que están altamente mielinizadas y poseen una elevada velocidad de conducción (70-120 m/s); ii) fibras $A\beta$, que están también altamente mielinizadas. Estos nervios están implicados en transducción mecánica sensorial; iii) fibras $A\delta$, compuestas por neuronas ligeramente mielinizadas que conducen con una velocidad intermedia (4-30 m/s). Estas fibras suelen ser polimodales, respondiendo a distintos estímulos medioambientales, y, iv) Fibras C no mielinizadas, que consisten de neuronas de tamaño pequeño, polimodales, que presentan velocidades de conducción baja (0.5-2.0 m/s). Las fibras $A\delta$ y C constituyen todos los nociceptores que surgen de los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino. Ambos tipos de fibras responden a una gran variedad de estímulos físicos como calor, frío, osmolaridad, UV, trauma, así como a agentes químicos (irritantes, pH, alergenicos, proteasas y microbios). Además, una reacción inflamatoria induce la sensibilización de estos nociceptores, incrementando su excitabilidad. En conjunto, las fibras aferentes son las encargadas de comunicar al cerebro información referente al estado de la piel, incluyendo la presencia de agresiones posiblemente dañinas así como la existencia de lesiones tisulares. Los nociceptores son los responsables últimos de comunicar la presencia de una reacción inflamatoria y de dolor.

A diferencia de los nervios aferentes, el sistema nervioso autonómico no inerva la epidermis en mamíferos. Los nervios autonómicos cutáneos derivan de neuronas colinérgicas simpáticas, aunque neuronas simpáticas también pueden liberar catecolaminas y neuropéptidos (1). La distribución y localización de estas fibras está restringida a la dermis donde inervan los vasos sanguíneos y linfáticos, los músculos erectores del pelo, las glándulas ecrinas y apocrinas, la glándula sebácea y los folículos capilares. El sistema nervioso autonómico juega un papel clave en la regulación de apéndices cutáneos y en definir la reacción vascular en la piel. No obstante, aunque la acetilcolina liberada por los nervios autonómicos es importante en la fisiología cutánea, los queratinocitos también pueden liberar este

neurotransmisor, indicando que la acetilcolina juega un papel clave en la epidermis. De hecho, hay indicios sólidos que muestran una regulación colinérgica de la adhesión celular en la que parecen estar implicados los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos expresados en los queratinocitos (1, 4).

Los nervios autonómicos en la piel también liberan neuropéptidos, incluyendo el NPY, el α -CGRP, la galanina, el péptido intestinal vasoactivo y el péptido natriurético atrial (3). Además, las neuronas simpáticas, así como las neuronas sensoriales, expresan neurotrofinas cutáneas (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) que están implicadas en la regulación de la nocicepción y la propiocepción, la mecanorrecepción, el crecimiento y desarrollo neuronales, la apoptosis, la homeostasis epidérmica, el crecimiento capilar y la melanogénesis (1). Las neurotrofinas están implicadas en diversas condiciones cutáneas como la dermatitis atópica en la que un incremento del NGF contribuye al prurito, la desgranulación de los mastocitos, la activación de eosinófilos, alteraciones en los queratinocitos, y la sensibilización de los nociceptores. Es más, en situaciones de estrés se puede incrementar la liberación periférica de neuropéptidos y neurotrofinas que producen la potenciación de la excitabilidad de las neuronas sensoriales, dando lugar a un proceso inflamatorio, conocido como inflamación neurogénica.

LA INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA

Aunque la inflamación neurogénica ha sido tradicionalmente considerada como una condición homogénea, existe una evidencia creciente indicando que la inflamación originada y establecida por los nociceptores es un proceso de elevada complejidad, altamente dinámico que implica múltiples e interrelacionadas vías neuromoduladoras en el sistema nervioso periférico (2). Así, más de 15 neurotransmisores han sido implicados en diversos aspectos de la transducción sensorial periférica. Varios estudios sustentan la noción de que la liberación de SP y α -CGRP representa el punto inicial del proceso inflamatorio neurogénico (3, 5). Estos neuropéptidos están localizados en una subpoblación de nociceptores en las fibras C y A δ caracterizados por su tamaño pequeño y su sensibilidad a capsai-

na, el ingrediente picante de los chilis e inervan todas las capas de la piel (Tabla I). Tras su liberación en respuesta a una lesión, estos neuropéptidos producen la inflamación neurogénica a través de su interacción con células endoteliales, mastocitos, células del sistema inmune y arteriolas. Ratones en los que genéticamente se ha eliminado la expresión de SP y α -CGRP muestran una reducida, prácticamente ausente, inflamación neurogénica en respuesta a una lesión periférica (6-8).

Tabla I. Los neuropéptidos SP y α -CGRP están presentes en todos los niveles de la piel

		EPIDERMIS (terminaciones periféricas)	DERMIS (terminaciones, folículo piloso)	HIPODERMIS (endotelio)
α-CGRP	Neuronas sensoriales	Humanos	Humanos	Humanos
	Co-expresa con SP	Ratones Gatos	Ratones Ratas Perros Gatos	Ratones Ratas
SP	Neuronas sensoriales	Humanos	Humanos	Humanos
	Co-expresa con α -CGRP	Ratones Cerdos Gatos	Ratones Ratas Perros Gatos Monos	Ratones Ratas Perros Gatos

Además de la sustancia P y el α -CGRP, otros neuropéptidos como el NPY son liberados en respuesta a un estímulo irritante (3). Estos péptidos también contribuyen a aumentar la sensación dolorosa del proceso de inflamación neurogénica. Por ejemplo, niveles incrementados de NPY se encontraron en el líquido sinovial de pacientes artríticos. Otros agentes pro-algésicos como el NGF, los protones, la histamina, las citocinas, las prostaglandinas, las quimocinas, el glutamato y el ATP también contribuyen a mantener la inflamación neurogénica. Estas moléculas sensibilizan los nociceptores bien mediante la regulación directa de la actividad de receptores presentes en la membrana de las neuronas o bien activando cascadas de señalización intracelular, como las mediadas por la PKA y la PKC. La activación de estas

rutas resulta en el incremento de la expresión de receptores neuronales y en su modificación post-traducciona, incrementando la excitabilidad neuronal (9, 10). La mayor actividad de los nociceptores proviene de dos fenómenos, por una parte, una disminución en el umbral de su activación y, por otra, de un incremento de la frecuencia de generación de potenciales de acción. La mayor excitabilidad de los nociceptores da lugar al fenómeno conocido como sensibilización periférica, que se traduce en una hipersensibilidad de la zona inflamada que puede producir una respuesta exagerada a un estímulo ligeramente nocivo (hiperalgesia) o, incluso, una sensación dolorosa a un estímulo no nocivo (alodinia). Una sensibilización periférica persistente puede provocar cambios sinápticos a nivel de la medula espinal y el cerebro originando la conocida como sensibilización central que aumenta aún más la percepción del dolor.

LOS RECEPTORES TRP SON SENSORES MOLECULARES

De lo expuesto se intuye que las neuronas sensoriales son un pivote esencial de la biología cutánea. La pregunta que emerge es ¿cómo integran y transducen los nociceptores los estímulos medio-ambientales y locales en excitabilidad neuronal? y, ¿qué mecanismos moleculares definen el estado inflamado de los nociceptores? Desde ya hace tiempo se conoce que una subpoblación de neuronas periféricas es excitada por la capsaicina (11). Este vanilloide tiene un efecto dual en estas neuronas; primero incrementa su excitabilidad para, seguidamente, promover su inactivación mediante un proceso conocido como desensibilización. Se sospecha que el fenómeno de desensibilización es el que media la actividad analgésica y anti-inflamatoria de la capsaicina, mientras que el incremento de la excitabilidad neuronal interviene en la sensación de quemazón que se percibe tras la aplicación del compuesto, similar a la sensación de calor que se aprecia al comer un chili (12). Desde el descubrimiento de la actividad de la capsaicina, se intuyó que esta bifuncionalidad del vanilloide se debía a la interacción del compuesto con un receptor neuronal específico. Esta hipótesis estaba sustentada por estudios de unión de radioligandos a extractos neuronales. No fue, sin embargo hasta el año 1997, en el que el grupo del Doctor David Julius, utilizando una estrategia de clonación-expresión, aisló el receptor neuro-

nal que une la capsaicina. Este receptor se ha acuñado con el nombre de TRPV1 (receptor de potencial transitorio sensible a vanilloides subunidad I). Además de ser activado por vanilloides, TRPV1 es estimulado por temperaturas nocivas, mostrando un umbral de activación de ≥ 42 °C, así como por pH extracelular ácido (13). La identificación de este receptor fue, sin duda, un hallazgo rompedor que propulsó nuestro conocimiento en los mecanismos moleculares involucrados en la biología sensorial (14). Es más, el conocimiento de TRPV1 fue el punto de partida para la identificación de la familia de los termorreceptores (Figura 1), proteínas de membrana que reconocen y transducen los estímulos térmicos en respuestas celulares, i. e. transforman la energía térmica en eléctrica.

LA FAMILIA DE TERMORRECEPTORES

Los nociceptores que expresan el receptor TRPV1 son bastante heterogéneos morfológica, neuroquímica y funcionalmente. En términos generales, son neuronas sensoriales peptidérgicas, de tamaño pequeño que producen las fibras C amielínicas, aunque algunas fibras A δ también expresan el receptor. TRPV1 fue localizado inicialmente en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino, en el asta dorsal de la medula espinal, y en el núcleo caudal del complejo del trigémino espinal (15). En los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino, las neuronas que expresan TRPV1 son más del 50%, y la mayoría responden a NGF y expresan los neuropéptidos SP y α -CGRP. Curiosamente, también se ha establecido la presencia de este termorreceptor en el cerebro donde su función es aún ignota (16). Además, estudios relativamente recientes han demostrado su existencia en células no neuronales y, en particular, en la piel se ha encontrado en los mastocitos, los queratinocitos, los folículos piloso y dérmico, los corpúsculos de Meissner y las células dendríticas, así como en adipocitos y sebocitos (17, 18). Por tanto, la localización de TRPV1 en células neuronales e inmunes cutáneas sugiere marcadamente que este receptor es un pivote fundamental en la fisiología y la patología de la piel. De hecho, TRPV1 influye en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, a la liberación de citocinas y de agentes pruritogénicos, contribuyendo así a generar el proceso de la inflamación neurogénica.

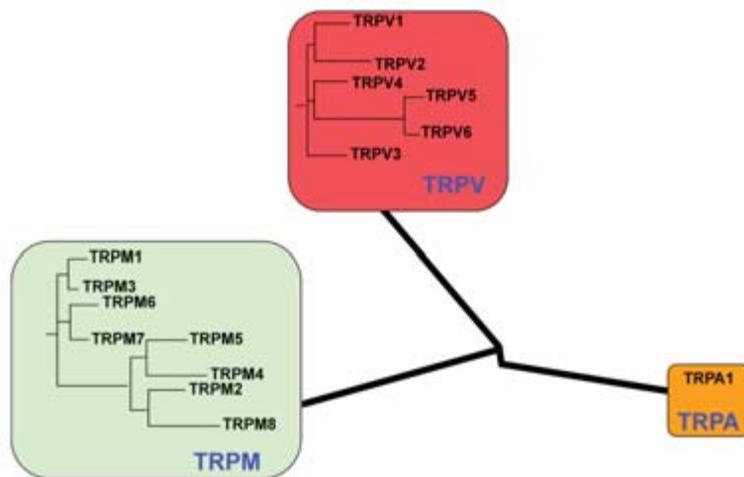


Figura 1. Diagrama ilustrativo de la familia de termorreceptores (Termo-TRPs): TRPV, TRPM y TRPA. Dentro de la familia TRPV son termorreceptores TRPV1-4, y dentro de la familia de TRPM son TRPM8 y TRPM5.

Tras la clonación de TRPV1, y mediante técnicas de biología molecular, pronto se identificaron otros receptores activados por temperatura (13). Así, se descubrió la existencia del receptor TRPV2, que presenta una temperatura de activación de 52 °C, siendo un sensor de temperaturas nocivas altas. Seguidamente, se publicó la identidad de TRPV3, un receptor cutáneo implicado en la detección de temperaturas templadas (> 33 °C). En humanos este receptor está expresado en las neuronas sensoriales y los queratinocitos (13). La función de TRPV3 en la piel está todavía en investigación, aunque su posible heterooligomerización con TRPV1 sugiere una función moduladora de la actividad de TRPV1. Además, como los queratinocitos están en íntimo contacto con las neuronas sensoriales, se ha propuesto que TRPV3 puede ser un elemento clave en la comunicación de estas células, actuando como sensor de temperatura cutáneo que libera agentes como el ATP para comunicarse paracrinamente con las neuronas sensoriales. Otro de los canales TRPV que se encuentra en la piel es TRPV4 que está presente en los queratinocitos, y las células de Merkel. TRPV4 es, principalmente, un receptor osmótico que, además, es activado por temperaturas > 25 °C. Su presencia en células endoteliales ha sugerido que juega un papel en vasodilatación que produce un aumento de temperaturas.

Molecularmente, los receptores TRPV son canales iónicos que permiten el paso de cationes a favor de su gradiente electroquímico, pero que no distinguen entre cationes divalentes y monovalentes. Están formados por la asociación de cuatro subunidades idénticas alrededor de un eje de simetría central (homooligómeros), aunque se ha propuesto la presencia de heterooligómeros entre TRPV1 y TRPV3. Cada subunidad presenta una organización en dominios estructurales y funcionales. Así, existe una región de membrana compuesta por seis segmentos de carácter hidrofóbico (S1-S6), con la presencia de un lazo hidrofílico entre los segmentos S5 y S6 que estructura el poro iónico que permite el paso de los cationes. Unidas a la región de membrana, hay dos segmentos intracelulares situados en los dominios N- y C-terminales. La región N-terminal presenta dominios de unión a anquirinas que median la interacción del receptor con proteínas citosólicas, formando un complejo proteico conocido como canalosoma. Este complejo es vital para la función del receptor. La composición molecular del mismo está siendo desvelada. El dominio C-terminal es también interesante tanto en su organización como en su función. En TRPV1, se ha sugerido que esta región contiene el sensor de temperatura, responsable de activar el canal tras superar la temperatura umbral de 42 °C. Existe además una zona de interacción con fosfoinosítidos que ejerce una función moduladora de la actividad del receptor. Y, en su extremo N-terminal, adyacente al segmento S6, se encuentra una secuencia de unos 25 aminoácidos, conocida como el dominio TRP, que tiene una función dual; por una parte, contribuye a la oligomerización de las subunidades para formar el tetrámero funcional; y, por otra, contribuye al acoplamiento funcional entre el reconocimiento del estímulo activante y la apertura del canal iónico (19-21). Complementariamente a estas regiones, los dominios citosólicos contienen secuencias de reconocimiento de proteínas cinasa que fosforilan el receptor regulando su actividad de canal iónico.

Además de los receptores TRP que responden a calor, también se han identificado los receptores neuronales que responden al frío (22). Así, el receptor TRPM8 es activado por temperaturas < 27 °C y compuestos naturales como el mentol. Este receptor es el responsable de la sensación refrescante del mentol. TRPM8 es expresado en una subpoblación de nociceptores de pequeño diámetro, pero que no ex-

presan TRPV1. A diferencia de TRPM8, el receptor TRPA1 se encuentra exclusivamente en nociceptores que contienen TRPV1. Este canal iónico se activa a temperaturas $< 17^{\circ}\text{C}$, es decir, es un sensor de temperaturas nocivas frías. TRPA1 es estimulado por una gran variedad de sustancias irritantes (incluidos la alicina, y el gas mostaza), así como responde a mentol e icilina, aunque se necesitan concentraciones superiores a las de TRPM8. No obstante, hay que mencionar que la función de TRPA1 como sensor de temperatura es todavía un debate abierto. En cualquier caso, la co-localización celular de TRPA1 con TRPV1 en neuronas sensoriales periféricas, sugiere que este receptor puede estar implicado también en la inflamación neurogénica.

TRPV1 E INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA

Cada vez es más claro que estos termorreceptores son centrales en la biología cutánea y, por tanto, en la manifestación de sus patologías. El mayor progreso en este campo proviene de los numerosos estudios realizados con el receptor TRPV1 que, por su amplia localización en neuronas y células del sistema inmune, y por ser un detector de temperaturas nocivas para el cuerpo humano, juega un papel crítico en el establecimiento y mantenimiento de la inflamación neurogénica. En los últimos años, se han publicado una larga lista de estudios mostrando la implicación de TRPV1 en la inflamación cutánea, y los mecanismos implicados en tal proceso. En particular, existe un gran consenso en considerar que la sensibilización inflamatoria de los nociceptores es el resultado de la potenciación de la actividad de TRPV1 por mediadores de la inflamación (9, 10). La sensibilización por agentes pro-algésicos puede ser por activación directa del canal o por el incremento de su función. La estimulación directa ha sido divulgada para compuestos lipídicos como los metabolitos del ácido araquidónico como la anandamida y la N-oleoildopamina que actúan como antagonistas débiles, pero que aumentan notablemente la actividad del canal. La acidosis isquémica que se genera durante el proceso de inflamación neurogénica es asimismo un activador directo y estimulador de la funcionalidad de TRPV1.

La potenciación indirecta esta mediada por la activación de rutas de señalización intracelular que implican, fundamentalmente, las cascadas de la PKA, la PKC, la Src y la PI-3K. Todas estas vías, a

través de sus componentes, convergen en TRPV1 incrementando dramáticamente su actividad de canal iónico. Obviando los detalles de los componentes moleculares envueltos, se han descrito dos mecanismos fundamentales, a saber, la modificación post-traduccional del receptor (ejemplo, la fosforilación), y el aumento de receptores en la membrana neuronal (Figura 2). La fosforilación del receptor tiene como consecuencia una estimulación de su función, acompañada de una disminución del umbral de temperatura de activación desde 42 °C a 35 °C, temperatura corporal humana (14). Esta reducción del umbral de activación es la responsable de la sensación dolorosa que experimenta una piel quemada por el sol en una ducha de agua templada.

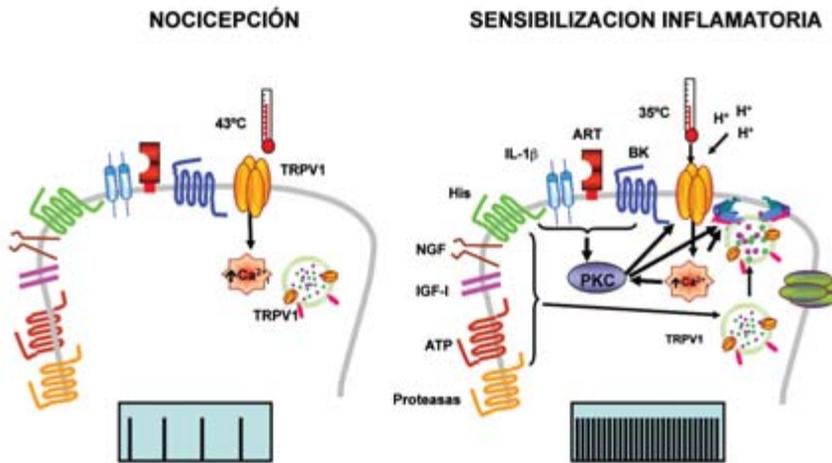


Figura 2. Esquema comparativo de la funcionalidad de las neuronas sensoriales durante la nocicepción y la sensibilización inflamatoria. En condiciones normales los nociceptores permanecen silenciosos. Tras la detección de un estímulo potencialmente nocivo (p. e., 43 °C) aumenta su actividad nerviosa aumentando su excitabilidad. En condiciones inflamatorias, los agentes proalgésicos activan sus receptores que, a su vez, estimulan rutas de señalización intracelular que convergen en el termorreceptor TRPV1, incrementando su actividad y expresión. Como resultado, la excitabilidad neuronal incrementa drásticamente, proceso conocido como sensibilización inflamatoria. Los cuadrados inferiores denotan actividad neuronal en forma de potenciales de acción.

El segundo de las vías indirectas implicadas es un incremento en la expresión de receptores en la superficie neuronal y, especialmen-

te, en las terminaciones periféricas. Este mecanismo está mediado por la inserción exocitótica de una población vesicular de receptores que se encuentra inmovilizada cerca de la membrana plasmática de las neuronas sensoriales (Figura 2). Tras la recepción de la injuria inflamatoria, se produce una rápida movilización de estos receptores a la membrana celular aumentando la densidad de los mismos e incrementando la sensibilidad de la terminación. Todo ello se traduce en una mayor excitabilidad de los nociceptores. La existencia de este mecanismo ha podido ser desvelada por la actividad inhibitoria de la potenciación inflamatoria de TRPV1 de compuestos que anulan o reducen la exocitosis neuronal, a saber, la neurotoxina botulínica A (BoNT A) y péptidos inhibidores de la exocitosis. Este resultado sugiere una actividad anti-inflamatoria y analgésica para estos compuestos que, de hecho, ha sido divulgada para la neurotoxina y está siendo evaluada para los péptidos anti-exocitóticos (23, 24). No cabe duda que en un futuro no muy lejano, la actuación farmacológica sobre la exocitosis regulada de receptores neuronales en las terminales periféricas se constituirá como una estrategia terapéutica y/o cosmética altamente valiosa.

CONCLUSIONES

En síntesis, la inflamación neurogénica, entendida como aquella en la que hay una participación neuronal, e independientemente de quien la inicie, es un fenómeno que requiere de la participación activa del sistema neuroinmune. Los dos, el sistema nervioso e inmune son igualmente culpables puesto que ambos se estimulan y se refuerzan. Ya se ha advertido que la inflamación neurogénica contribuye de forma esencial en la etiología de diversas patologías cutáneas y viscerales como la artritis, la vulvodinia, y la sensibilidad intestinal entre otras (Tabla II). Asimismo, se empiezan a acumular pruebas que implican a la inflamación neurogénica como un componente básico en condiciones cutáneas como las pieles sensibles, el prurito, las dermatitis, el acné, la psoriasis y la alopecia *aerata*. En algunas condiciones ya se ha estado utilizando la capsaicina tópica como tratamiento. Por tanto, el notable progreso realizado en los últimos años en la comprensión del sistema neuroinmune cutáneo ha comenzado a dar sus frutos. No nos extrañe, pues, que los próxi-

mos dermofarmacéuticos y dermocosmecéuticos tengan como diana farmacológica a la inflamación neurogénica y, en particular, a los receptores neuronales que contribuyen a ella como el termorreceptor TRPV1 y los mecanismos responsables de su potenciación inflamatoria.

Tabla II. **Patologías y condiciones cutáneas con un componente inflamatorio neurogénico y participación probable de TRPV1**

PATOLOGÍA	AFECCIÓN CUTÁNEA
Artritis	Pieles Sensibles
Neuropatía Diabética	Prurito
Migraña	Dermatitis atópica, alérgica y contacto
Vulvodinia	Urticaria crónica
Sensibilidad Intestinal	Acné vulgaris
Sensibilidad Ocular	Psoriasis
Sensibilidad Dental	Alopecia aerata
Neuropatías Oncológicas	Eczema

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los miembros de mi grupo por su contribución diaria en este campo. Y a mis colaboradores los Doctores Ángel Messeguer, Rosa Planells Cases, Carlos Belmonte, Félix Viana, Ana Gomis, Cristina Carreño, Wim Van Den Nest, Marco Caprini, Stefano Ferroni y Michaela Kress. Nuestra investigación está financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Programas SAF y Consolidar-Ingenio 2010), la Generalitat Valenciana, la Fundació la Marató de TV3, la Fundación Botín, DiverDrugs y Lipotec.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S. W., Bunnett, N. W. & Steinhoff, M. (2006) Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol. Rev.* 86: 1309-1379.
2. Steinhoff, M., Stander, S., Seeliger, S., Ansel, J. C., Schmelz, M. & Luger, T. (2003) Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch. Dermatol.* 139: 1479-1488.

3. Peters, E. M., Ericson, M. E., Hosoi, J., Seiffert, K., Hordinsky, M. K., Ansel, J. C., Paus, R. & Scholzen, T. E. (2006) Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* 126: 1937-1947.
4. Fuhlbrigge, R. C. & Weishaupt, C. (2007) Adhesion molecules in cutaneous immunity. *Semin. Immunopathol.* 29: 45-57.
5. Joachim, R. A., Kuhlmei, A., Dinh, Q. T., Handjiski, B., Fischer, T., Peters, E. M., Klapp, B. F., Paus, R. & Arck, P. C. (2007) Neuronal plasticity of the «brain-skin connection»: stress-triggered up-regulation of neuropeptides in dorsal root ganglia and skin via nerve growth factor-dependent pathways. *J. Mol. Med.* 85: 1369-1378.
6. Cao, Y. Q., Mantyh, P. W., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Epstein, C. J. & Basbaum, A. I. (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature.* 392: 390-394.
7. Bhatia, M., Slavin, J., Cao, Y., Basbaum, A. I. & Neoptolemos, J. P. (2003) Preprotachykinin-A gene deletion protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 284: G830-G836.
8. Salmon, A. M., Damaj, M. I., Marubio, L. M., Epping-Jordan, M. P., Merlo-Pich, E. & Changeux, J. P. (2001) Altered neuroadaptation in opiate dependence and neurogenic inflammatory nociception in alpha CGRP-deficient mice. *Nat. Neurosci.* 4: 357-358.
9. Messeguer, A., Planells-Cases, R. & Ferrer-Montiel, A. (2006) Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr. Neuropharmacol.* 4: 1-15.
10. Planells-Cases, R., García-Sanz, N., Morenilla-Palao, C. & Ferrer-Montiel, A. (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch.* 451: 151-159.
11. Szallasi, A. & Appendino, G. (2004) Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse? *J. Med. Chem.* 47: 2717-2723.
12. Lynn, B. (1990) Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. *Pain.* 41: 61-69.
13. Montell, C. & Caterina, M. J. (2007) Thermoregulation: channels that are cool to the core, *Curr. Biol.* 17: R885-R887.
14. Caterina, M. J. (2007) Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R64-R76.
15. Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A. & Eid, S. R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 357-372.
16. Di, M., V, Gobbi, G. & Szallasi, A. (2008) Brain TRPV1: a depressing TR(i)P down memory lane? *Trends Pharmacol. Sci.*
17. Toth, B. I., Geczy, T., Griger, Z., Dozsa, A., Seltmann, H., Kovacs, L., Nagy, L., Zouboulis, C. C., Paus, R. & Biro, T. (2008) Transient Receptor Potential

Vanilloid-1 Signaling as a Regulator of Human Sebocyte Biology. *J. Invest. Dermatol.*

18. Stander, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpachovitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B. M., Luger, T. A., Metz, D. & Steinhoff, M. (2004) Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.* 13: 129-139.
19. Valente, P., García-Sanz, N., Gomis, A., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C. & Ferrer-Montiel, A. (2008) Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB J.* 22: 3298-3309.
20. García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sánchez, E., Fernández-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J. Neurosci.* 24: 5307-5314.
21. García-Sanz, N., Valente, P., Gomis, A., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C. & Ferrer-Montiel, A. (2007) A role of the transient receptor potential domain of vanilloid receptor I in channel gating. *J. Neurosci.* 27: 11641-11650.
22. Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A. & Noguchi, K. (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* 493: 596-606.
23. Lucioni, A., Bales, G. T., Lotan, T. L., McGehee, D. S., Cook, S. P. & Rapp, D. E. (2008) Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU. Int.* 101: 366-370.
24. Tugnoli, V., Capone, J. G., Eleopra, R., Quatrala, R., Sensi, M., Gastaldo, E., Tola, M. R. & Geppetti, P. (2007) Botulinum toxin type A reduces capsaicin-evoked pain and neurogenic vasodilatation in human skin. *Pain.* 130: 76-83.

* **Información de contacto:**

Doctor Antonio Ferrer Montiel.

Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández.

Avda. de la Universidad, s/n. 03202, Elche.

Teléfono: 96 665 87 27. Fax: 96 665 87 58.

Email: aferrer@umh.es

Dieta hipocalórica y longevidad

María Cascales Angosto *

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Recibido el 12 de marzo de 2009.

RESUMEN

El envejecimiento va asociado a la pérdida progresiva de las funciones del organismo, debido al deterioro celular, disfunción mitocondrial e inestabilidad genómica. Como la mitocondria es muy susceptible a la lesión, el recambio mitocondrial es crítico para mantener la producción de energía, prevenir el estrés oxidativo y promover el envejecimiento saludable. Muchos factores endógenos y exógenos, entre ellos la dieta hipocalórica, las sirtuinas y el resveratrol, regulan la biogénesis mitocondrial, al activar el PGC-1 α (co-activador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas). La dieta hipocalórica prolonga la vida al reorganizar el metabolismo mitocondrial y reducir la generación de especies reactivas de oxígeno que causan daño a las macromoléculas. La actividad de las sirtuinas, productos de los genes de longevidad *Sirt*, se induce por la dieta hipocalórica y se controla por los cambios en el cociente intracelular NAD/NADH. Las sirtuinas son desacetilasas dependientes del NAD que establecen conexión entre la función mitocondrial, el metabolismo y la longevidad. El resveratrol, un mimético de la dieta hipocalórica, activa las sirtuinas e inhibe algunos de los efectos indeseables del envejecimiento.

Palabras clave: Envejecimiento; Mitocondria; Dieta hipocalórica; Sirtuinas; Resveratrol.

ABSTRACT**Low-calorie diet and longevity**

Aging is associated with an overall loss of function at the level of the whole organism due to cellular deterioration, mitochondrial dysfunction and genomic instability. As mitochondria are particularly susceptible to damage, mitochondrial turnover is critical for the maintenance of energy production, prevention of oxidative stress and promotion of healthy aging. Multiple endogenous and exogenous factors, such as calorie restriction, sirtuins and resveratrol regulate mitochondrial biogenesis, through activation of PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1alpha). Calorie restriction lengthens lifespan, due to mitochondrial metabolism reorganization and by reducing radical oxygen species levels that cause macromolecule damage. The activity of sirtuins, the products of anti-aging genes *Sirt*, is induced by hypocaloric diet and controlled by changes in intracellular NAD/NADH ratio. Sirtuins are NAD-dependent protein deacetylases, that provide a key link between mitochondrial function, metabolism and longevity. Resveratrol, a proposed mimetic of calorie restriction, through sirtuins activation, inhibits some unwanted effects of aging.

Key words: Aging; Mitochondria; Calorie restriction; Sirtuins; Resveratrol.

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso complejo, que se detecta, tanto en células aisladas como en órganos y tejidos, en el que se encuentran implicados factores genéticos y ambientales. Las teorías sobre el envejecimiento tienen su origen en el estudio de los cambios que se suceden o de los cambios que se acumulan a lo largo de la vida. La teoría que ha alcanzado más popularidad por haber sido ampliamente comprobada, fue propuesta por Harman en 1956 (1) y es la que responsabiliza a los radicales libres de oxígeno de las alteraciones oxidativas típicas de la edad avanzada. Esta teoría se dirigió, posteriormente, hacia la generación de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria.

La teoría programada del envejecimiento propone que el progresivo declinar de la función de los tejidos, debida a la edad, se debe a cambios homeostáticos en los procesos biológicos que ocurren en ausencia de enfermedad. Los modelos extrínsecos proponen que el envejecimiento es el resultado de continuas agresiones ambientales que conducen a una gradual disminución de las funciones tisulares. Se ha propuesto también, que las características biológicas de la edad se deben a cambios en procesos básicos endógenos que se aceleran por estas agresiones ambientales, lo cual afecta a la estructura y función de las proteínas, que regulan familias de genes de respuesta al estrés.

Por tanto, el envejecimiento en los seres vivos se caracteriza por un progresivo descenso en la función de órganos y tejidos, asociado al daño oxidativo a las macromoléculas, disfunción mitocondrial, alteraciones endocrinas e inestabilidad genómica. La capacidad regenerativa tisular también declina con la edad y en algunos tejidos, músculo, sangre, hígado y cerebro, este declinar se ha atribuido a una menor respuesta de las células madre y progenitoras específicas de cada tejido.

La dieta juega un papel muy importante en el proceso irreversible que conduce al envejecimiento, pues la restricción de su contenido calórico consigue aminorar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la mitocondria. Por tanto, la dieta hipocalórica se presenta como uno de los medios más efectivos para asegurar una buena salud en la vejez e incluso prolongar la vida. Existen evidencias que demuestran el efecto beneficioso de la dieta restrictiva sobre animales de experimentación, en los que se ha observado una progresión más lenta del propio envejecimiento, un retraso en la aparición de los achaques de la senectud y un aumento de la esperanza de vida (2).

2. ENVEJECIMIENTO Y GENES DE LONGEVIDAD

Es un hecho reconocido el papel que juega la nutrición en la serie de eventos moleculares que conducen a la vejez y también que la restricción calórica de la dieta aumenta la expectativa de vida, retrasa el declinar de la función inmune y reduce la incidencia del cáncer

y la mortalidad en diferentes especies animales. Sin embargo, se conoce poco aún sobre los mecanismos celulares y moleculares que producen estos efectos positivos. La dieta hipocalórica supone la reducción del contenido calórico de la dieta, sin que ello comprometa a los nutrientes esenciales. La teoría, ampliamente aceptada, de los radicales libres y el envejecimiento, antes citada, hace responsables a las ROS, al estrés oxidativo y a la modificación oxidativa de las macromoléculas, del declinar de las funciones fisiológicas en la senectud. Los efectos beneficiosos que aporta el menor contenido calórico de la dieta sobre las alteraciones típicas del estado senescente, se basan en la menor generación de ROS y de las lesiones oxidativas del DNA, con la consiguiente disminución de los defectos a nivel transcripcional, traduccional y post-transduccional.

La senectud se caracteriza por un incremento exponencial de proteínas alteradas por oxidación, lo cual conlleva la activación transcripcional de genes de respuesta al estrés, que procesan la eliminación de proteínas lesionadas o mal plegadas. Se ha observado que las dietas restringidas en calorías previenen esta inducción, lo cual ha hecho pensar que la modificación proteica por oxidación o glicación, juega un papel decisivo en el envejecimiento. Las dietas hipocalóricas actúan disminuyendo la velocidad metabólica y como consecuencia la producción de subproductos tóxicos del metabolismo. La disminución de la transcripción de genes que se inducen en respuesta al estrés, implicados en la detoxificación, reparación del DNA y de respuesta al estrés oxidativo, inducida por la restricción calórica, se debe a la menor disponibilidad de los sustratos para estos sistemas. Los perfiles transcripcionales encontrados en animales alimentados con dietas bajas en calorías sin deficiencias en nutrientes esenciales, muestran una desviación dirigida hacia un mayor recambio proteico y a una menor lesión macromolecular. Este cambio puede detectarse a nivel hormonal, por ejemplo, sobre las vías señalizadoras de la insulina mediante el incremento de la expresión de los genes que median la sensibilidad a esta hormona.

Durante mucho tiempo se ha considerado que el envejecimiento de un organismo era un proceso genéticamente programado como continuación activa del desarrollo, de manera que una vez que un individuo alcanzaba la madurez, los genes del envejecimiento (*aging genes*) comenzaban a expresarse y a dirigir el progreso hacia la muerte.

Esta idea se ha descartado y hoy se considera que el envejecimiento es un desgaste, que depende del tiempo, debido a que disminuyen los sistemas de reparación para el mantenimiento normal de las funciones. La selección natural evolutiva no encuentra razón para mantener estos sistemas reparadores una vez que el organismo ha superado su máxima capacidad reproductora.

Diversos grupos de investigadores han encontrado una familia de genes implicados en la capacidad de la célula para superar situaciones adversas (elevada temperatura, falta de alimento, etc.), que mantienen las defensas y actividades reparadoras naturales a lo largo de toda la vida. Si se logra que el funcionamiento del organismo esté en buenas condiciones, estos genes proporcionarán oportunidades para superar el estrés, mantener la salud y conseguir la longevidad. En contraposición a los genes de envejecimiento, antes aludidos, éstos se denominan *genes de longevidad*.

La evolución ha favorecido un sistema universal regulador que coordina la respuesta al medio ambiente. La identificación de genes que dirigen los mecanismos implicados en las defensas naturales de respuesta al medio adverso y controlan la longevidad, ha de proporcionar un medio de evitar las enfermedades y achaques propios del envejecimiento. Muchos genes de reciente descubrimiento, como *daf-2*, *pit-1*, *amp-1*, *clk-1* y *p66Shc*, intervienen en la resistencia al estrés y en la longevidad y forman parte de un mecanismo fundamental de supervivencia frente a la adversidad. Sinclair y Guarente (3) han estudiado un gen denominado *Sir2*, cuyas variantes se encuentran en diversos organismos, desde la levadura hasta los humanos, y han observado que copias extra de este gen elevan la longevidad en seres vivos tan diversos como la levadura *S. cerevisiae*, el nematodo *C. elegans*, la mosca *Drosophila* y ratones.

2.1. Sirtuinas

En el año 2000, Leonard Guarante del Instituto de Tecnología de Cambridge (MS) (4-6), descubrió que la dieta baja en calorías producía la activación de la transcripción de un gen denominado *Sir2*, con capacidad para retrasar el envejecimiento. Este gen, que codifica la proteína SIR2, denominada sirtuina, se encontraba en mayor

concentración en la mosca *Drosophila* cuando ésta se sometía a un menor aporte calórico en su dieta, demostrándose con esto que la proteína SIR2 desempeñaba un papel central en el ciclo metabólico celular. A partir de este hallazgo, estos autores crearon una mosca mutante que sobreexpresaba la sirtuina, y descubrieron que dichas moscas podían vivir hasta un 60% más que las normales. Asimismo, demostraron que el gen *Sir2* se relaciona con mayor esperanza de vida también en la levadura y en el nematodo.

Las proteínas SIR (*silent, information regulador*), regulan la longevidad en muchos organismos. En levadura, una copia extra del gen *Sir2* alarga la vida, mientras que la eliminación de dicho gen la acorta. La proteína SIR silencia la cromatina, aumenta la capacidad de reparación del DNA y se encuentra implicada en la fidelidad cromosómica durante la meiosis. Guarente *et al.* (4-6), al seleccionar colonias de levadura que mostraban larga vida, encontraron una mutación en el gen *Sir4*, que codifica parte de un complejo de proteínas que contenía la proteína Sir2. La mutación en el gen *Sir4* hizo que la proteína Sir2 se uniese a la región más repetitiva del genoma de la levadura, un tramo que contiene los genes que codifican los ribosomas, que se conoce como DNA ribosómico (rDNA). Más de 100 de estas repeticiones de rDNA existen en el genoma de la levadura, y son difíciles de mantener en un estado estable. Estas secuencias repetitivas tienen la capacidad de recombinarse entre ellas, proceso que extrapolado en humanos podría ocasionar enfermedades tales como el cáncer o la enfermedad de Huntington. Los datos obtenidos por este grupo de investigadores les llevaron a sugerir que el envejecimiento en la levadura era causado por la inestabilidad producida por el rDNA que se consiguió atenuar por acción de las proteínas Sir.

Estudiando esta inestabilidad del rDNA, se observó que al dividirse la célula madre de la levadura se generaban más copias de rDNA que salían del genoma a modo de círculos o anillos extracromosómicos (ERC) y se replicaban con los cromosomas, permaneciendo en el núcleo de la célula. A medida que se acumulaban los ERC, la célula necesitaba más energía para su replicación, lo que llegaba a incapacitarla para replicar su propio genoma. En estas condiciones se detectó, que si se añadía una copia extra del gen *Sir* a la célula madre, se conseguía reprimir la formación de los ERC en las células hijas, y con ello se prolongaba la vida de la célula. El gen *Sir2* de la levadura, al codi-

ficar la proteína SIR2 con actividad histona desacetilasa dependiente de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), elimina grupos acetilo de las histonas, consiguiendo empaquetar al DNA de tal manera, que lo hace inaccesible a los enzimas responsables de sacar los ERC fuera del cromosoma. La forma del DNA con histonas desacetiladas es silente debido a que cualquier gen que se encuentre en estas regiones del genoma es inaccesible a la activación. Por tanto, las proteínas SIR2, se encuentran implicadas en la silenciación de genes. La actividad desacetilasa de SIR dependiente del NAD, y la asociación SIR2-NAD establece conexión entre SIR y el metabolismo glucolítico.

Con el descubrimiento de las proteínas SIR se ha demostrado la existencia de una nueva misión para el NAD en la regulación transcripcional. Las proteínas SIR2 necesitan del NAD para su actividad desacetilasa, que regula una serie importante de procesos biológicos. Por tanto, el mantenimiento de los niveles de NAD en la célula, es un requisito importante para la expresión y actividad de las sirtuinas. SIR2/SIRT1 juega un importante papel en diversos procesos biológicos, como respuestas al estrés y a citoquinas, diferenciación y metabolismo, mediante la desacetilación de reguladores transcripcionales. Las proteínas SIR2 poseen la capacidad única de acoplar la rotura del NAD y la desacetilación de las proteínas por formación de nicotinamida y *O*-acetil-ADP ribosa. El requerimiento de NAD implica que SIR2/SIRT1 funciona como sensor de energía o sensor redox que conecta el metabolismo energético con la regulación transcripcional (Figura 1).

Las sirtuinas son una clase de proteínas evolutivamente conservadas que regulan una variedad de funciones celulares tales como el mantenimiento del genoma, la longevidad y el metabolismo. En mamíferos existen siete homólogos de la SIR2 de levadura, SIRT1-7 (Tabla 1), que contienen un dominio catalítico con 275 aminoácidos. Se ha demostrado el papel que juegan estas sirtuinas como reguladores del envejecimiento, lo cual las convierte en objetivos farmacológicos potenciales para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la edad. Las proteínas SIRT1-7 difieren en su localización subcelular y en las secuencias proteicas amino y carboxilo terminales que flanquean el núcleo catalítico altamente conservado, identificado por primera vez en la proteína SIR2 de levadura, que parece poseer motivos de interacción con otras proteínas y señales de localización

celular. La mayoría de estas sirtuinas catalizan la desacetilación dependiente de NAD^+ , de residuos de lisina amino acetilados de sustratos proteicos (Figura 1). SIRT4 y SIRT6 median la ADP-ribosilación de sustratos proteicos utilizando NAD^+ como donador. Las sirtuinas de mamíferos tienen múltiples sustratos y afectan a un amplio espectro de funciones celulares (Tabla 1). De las siete sirtuinas de mamíferos, tres de ellas (SIRT1, 6 y 7) se localizan en el núcleo. La más estudiada es la SIRT1, que actúa sobre más de una docena de sustratos conocidos y ejerce un papel protector frente al estrés oxidativo y al daño al DNA. Además, la SIRT1 juega un papel prominente en tejidos metabólicos, como páncreas, hígado y tejido adiposo. SIRT6 y SIRT7 son reguladores importantes del metabolismo y daño al DNA.

Tabla 1. **Diversidad de las sirtuinas de mamíferos (7)**

Sirtuina	Actividad	Localización	Interacciones	Biología
SIRT1	Desacetilasa	Núcleo	FOXO, PGC-1 α	Supervivencia celular/metabolismo
SIRT2	Desacetilasa	Citosol	Tubulina, H4	Ciclo celular
SIRT3	Desacetilasa	Mitocondria	AceCS2	Termogénesis/metabolismo
SIRT4	ADP-ribosil-transferasa	Mitocondria	GDH	Secreción de insulina/metabolismo
SIRT5	Desacetilasa	Mitocondria	?	?
SIRT6	ADP-ribosil-transferasa	Núcleo	DNA Pol β	Reparación del DNA
SIRT7	?	Nucleolo	Pol I	Transcripción de rDNA

No se ha determinado aún el papel de las sirtuinas de mamíferos en la regulación de la longevidad, aunque evidencias obtenidas hacen pensar que SIRT1, regula muchos procesos fisiológicos afectados por la edad. SIRT1 desacetila un gran número de sustratos: p53,

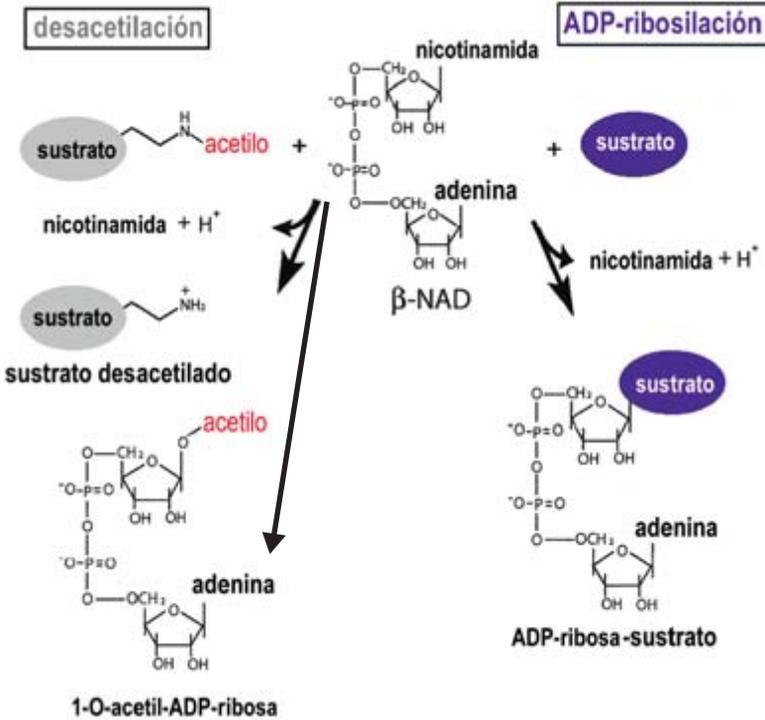


Figura 1. Las sirtuinas catalizan las reacciones de desacetilación o de ADP ribosilación de un sustrato proteico. Ambas reacciones rompen la molécula de NAD y liberan nicotinamida [Modificado de (7)].

Ku70, NF- κ B, y las proteínas forkhead FOXO, lo cual se relaciona con la resistencia al estrés que confiere la restricción dietética. SIRT1 también regula las actividades de los receptores nucleares PPAR γ y del coactivador PGC-1 α , para influenciar la diferenciación de las células musculares, adipogénesis, almacenamiento de grasa en tejido adiposo blanco y metabolismo hepático, sugiriendo una conexión entre esta sirtuina y las dietas que promueven el adelgazamiento y la longevidad.

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa se verifica por el hígado y por las células β pancreáticas, en respuesta al cambio de nutrientes. Durante el ayuno los hepatocitos inducen la gluconeogénesis para suministrar glucosa a los tejidos. Se ha revelado que esta respuesta se encuentra bajo un control estricto de la actividad SIRT1,

lo que proporciona otra conexión entre SIRT1 y el metabolismo intermediario. En hepatocitos en cultivo, SIRT1 interacciona y desacetila a FOXO1, promoviendo la transcripción, dependiente de FOXO1, de los genes hepáticos gluconeogénicos. En el hígado, el coactivador transcriptional PGC-1 α conduce también la expresión de vías gluconeogénicas. SIRT1 desacetila y activa PGC-1 α para coordinar, durante el ayuno, el incremento en la expresión de genes gluconeogénicos con la represión de los glucolíticos.

3. DIETA HIPOCALÓRICA Y EXPECTATIVA DE VIDA

La dieta hipocalórica produce un retraso en la aparición de los achaques propios del envejecimiento. Aunque los mecanismos implicados en este fenómeno no están completamente esclarecidos, es probable que la restricción dietética promueva efectos sobre la frecuencia de la glucolisis. Así, en condiciones de alimentación *ad libitum* la glucolisis es continua (hay un exceso de glucosa), mientras que en casos de dieta hipocalórica, la glucolisis es discontinua operando solo postprandialmente. Durante los periodos de ayuno inducido por restricción de las calorías de la dieta, el cociente NAD⁺/NADH ha de ser diferente del que prevalece en caso de *ad libitum* donde la situación de ayuno no es probable. En el caso de alimentación *ad libitum* la continua glucolisis tiende a disminuir la disponibilidad de NAD y al acúmulo de NADH, mientras que en el caso de ayuno inducido por la dieta hipocalórica disminuye la demanda glucolítica de NAD y aumenta la oxidación del NADH. En la Figura 2 se muestra como la vía glucolítica requiere del NAD para oxidar la glucosa, por tanto los niveles citoplasmáticos de NAD son bajos. En caso de dieta restringida, al ser menor la fuente carbonada (glucosa) que se transfiere hacia la glucolisis, se consume menos NAD y como resultado «sobra» el suficiente NAD necesario para activar a las sirtuinas, que al desacetilar las proteínas histonas y no histonas, favorecen, como consecuencia, la longevidad.

Por otro lado, cuando las células se someten a restricción calórica (nutrientes sí, pero no calorías), existe otra vía que mantiene elevados los niveles de NAD. En estas condiciones restrictivas, se inicia un proceso en cascada, a través de la membrana celular. Una

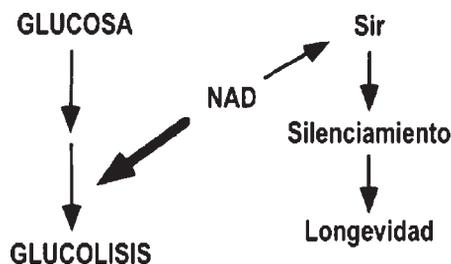


Figura 2. SIR2 requiere NAD para su actividad y este acoplamiento se produce en el caso de dieta hipocalórica cuando se reduce la fuente carbonada que se transfiere hacia la glucólisis y como resultado «sobra» NAD citoplásmico. Sir2 actúa como sensor de los niveles del NAD. En condiciones de dieta hipocalórica los niveles del NAD son altos, se activa Sir2, el silenciamiento de genes y la longevidad [Modificado de (8)].

señal activa al gen *Nampt*, y la proteína enzimática resultante se acumula dentro de la célula. La mayor actividad de la Nampt (nicotinamido fosforibosil transferasa), eleva la concentración de NAD, y la mayor concentración celular de NAD intensifica la actividad reguladora transcripcional del dominio catalítico de SIRT1. El perfil de la expresión genética ha demostrado que existe una estrecha relación entre la expresión de *Nampt* y la de SIRT1 (Figura 3). El acumulo del NAD en el interior de las mitocondrias ejerce un efecto posterior y es el de aumentar la actividad de otras dos proteínas mitocondriales producidas por los genes *SIRT3* y *SIRT4*.

El efecto combinado de todos estos procesos hace que las mitocondrias se robustezcan y aumenten su producción de energía, lo que conlleva un retraso en el envejecimiento celular. Resumiendo, la dieta baja en calorías eleva las concentraciones de *Nampt*, NAD, SIRT3 y SIRT4, y todo junto hace que la célula vida más y con más energía.

Hace más de setenta años que McCay y colaboradores (1934) (10) demostraron que una reducción en la ingesta total de alimentos prolongaba la vida de las ratas. Durante estos años muchos laboratorios han repetido con éxito los experimentos de McCay utilizando ratas y ratones, peces, moscas y gusanos. Así, la restricción dietética se ha establecido como un medio experimental poderoso para estudiar el envejecimiento, llegando a ser una de las áreas más ac-

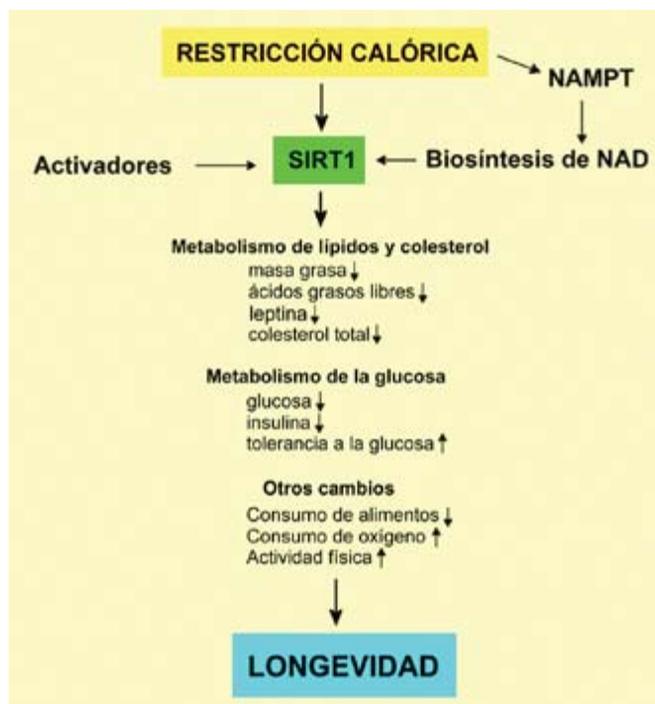


Figura 3. SIRT1 como mediador clave en la respuesta a la restricción calórica. Los activadores químicos de SIRT1 y la biosíntesis de NAD por NAMPT (nicotinamido fosforibosil transferasa) median estos cambios fisiológicos a través de la activación de SIRT1 [Modificado de (9)].

tivas de investigación en el campo de la biogerontología. La prolongación de la supervivencia por la restricción de alimentos parece que se debe a alteraciones en el proceso de envejecimiento, pero los mecanismos implicados mediante los cuales esta restricción ejerce sus efectos beneficiosos permanecen aún sin aclarar. La identificación de objetivos antienvjecimiento y anticáncer de la dieta hipocalórica y la de los mecanismos moleculares que intervienen en estos efectos podría proporcionar medios para intervención en humanos. Estudios de los laboratorios de Masoro (1990) (11) han demostrado que la mayor supervivencia de roedores por restricción de alimento se debe a la dieta hipocalórica. Es interesante destacar, que esta mayor supervivencia se asocia al retraso en enfermedades tales como el cáncer, lo cual hace a menudo proponer que la dieta hipocalórica

aumenta la supervivencia simplemente porque retrasa los procesos patológicos dependientes de la edad, más que por ejercer efecto sobre el envejecimiento o la senectud. Aunque la distinción entre senescencia y enfermedad es a veces difícil de interpretar, se ha demostrado que la dieta hipocalórica retrasa los cambios asociados a la avanzada edad en la mayoría de los procesos fisiológicos y que estos cambios preceden generalmente a cualquier alteración observada en situaciones patológicas y de enfermedad. Algunos laboratorios han demostrado que la restricción de metionina de la dieta eleva la expectativa de vida y el período vital máximo de ratas (12). Otros describen que la restricción de metionina es la clave de la prolongación de la vida por la restricción calórica de la dieta. Hasta la fecha la restricción calórica es la estrategia experimental conocida que prolonga la supervivencia y retrasa el envejecimiento. Varias hipótesis se han emitido para explicar las bases de los mecanismos mediante los cuales la dieta hipocalórica prolonga la vida. Originalmente se propuso que se alargaba la supervivencia porque se retrasaba el crecimiento y el desarrollo. Más tarde, se propuso que era la reducción en el contenido en grasa corporal la base fisiológica de la prolongación de la supervivencia. Recientes investigaciones se dirigen hacia el impacto de la dieta restringida sobre la respuesta al estrés y los mecanismos de señalización. Hoy en día, las hipótesis principales para explicar el efecto de la dieta hipocalórica son:

1. Atenuación del daño oxidativo.
2. Alteración del sistema glucosa/insulina.
3. Alteración de la hormona del crecimiento/IGF-1, y
4. Hormesis.

La *atenuación del daño oxidativo* por efecto de la dieta hipocalórica se ha detectado en las macromoléculas, DNA, proteínas y lípidos. Esto se debe a la menor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la mayor generación de mecanismos protectores, a la mayor capacidad reparadora o a una combinación de todas ellas. La premisa *glucosa/insulina* es que la dieta hipocalórica reduce la concentración de glucosa plasmática e insulina, con la consiguiente reducción de la señalización por insulina. Últimamente, se propone un incremento en la efectividad de la glucosa y en la respuesta a la

insulina o ambas. Esta hipótesis se ha emitido a la luz de los datos que muestran que la pérdida de los sistemas señalizadores de la insulina originan una prolongación de la vida en muchos organismos (nematodos, moscas de la fruta, etc.). Además, la restricción calórica reduce la *señalización por el IGF-1*, observada en modelos de mamíferos con una mayor supervivencia. La *hormesis* propone un beneficio a la salud a partir de agentes estresantes de baja intensidad. La restricción calórica puede funcionar a través de la hormesis, ya que puede actuar como un estresante suave que produce una respuesta adaptativa tal como el elevado mantenimiento de los sistemas de reparación. La dieta hipocalórica, como parte del efecto hormético eleva la expresión de genes de respuesta al estrés. En línea con la restricción calórica como agente estresante de baja intensidad, es relevante sugerir que los enzimas implicados en las vías de reparación del DNA pueden funcionar como productos de genes de respuesta al estrés cuando se exponen a una dieta hipocalórica.

Los mecanismos mediante los cuales la dieta hipocalórica ejerce sus efectos beneficiosos son en el momento actual un desafío tentador para los investigadores en base al desarrollo de fármacos que pudieran reproducir estos efectos saludables. El fenómeno, atribuido en un principio al metabolismo celular más lento y a una reducción de los subproductos tóxicos en respuesta a la menor cantidad de alimento, es demasiado simple y las recientes investigaciones demuestran que no es del todo correcto. La restricción calórica de la dieta no retrasa el metabolismo, más bien como estresante biológico (escasez de alimento), induce una respuesta defensiva, y es esa respuesta la que estimula las posibilidades de supervivencia del organismo. En mamíferos su efecto incluye cambios en los mecanismos celulares de reparación, producción de energía y activación de la apoptosis.

El régimen dietético hipocalórico implica la reducción del 30 al 40% del consumo de alimento *ad libitum*. En animales (ratas, perros y primates) sometidos a esta dieta restrictiva, se ha demostrado que no sólo viven más, sino que se mantienen más sanos durante la prolongación de sus vidas. Esto indica que este régimen, además de aumentar la supervivencia, evita o retrasa la mayoría de enfermedades asociadas a la senectud, como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas.

La menor disponibilidad de nutrientes ejerce importantes efectos sobre el metabolismo celular y el funcionamiento mitocondrial. En condiciones de escasez de alimento la concentración de ADP se eleva y es el influjo de ADP en la mitocondria lo que gobierna la eficacia de la cadena de transporte electrónico. Por el contrario, un exceso de nutrientes produce una elevada concentración de ATP, lo que se traduce en una baja demanda energética (bajos niveles de ADP) que causan un subóptimo funcionamiento mitocondrial, unido a una elevada generación de ROS.

4. ESTABILIDAD GENÓMICA

La protección del DNA es un elemento clave en la prevención del cáncer y en el retraso del fenotipo senescente. Cuando la lesión persiste en el genoma, mediante procesos replicativos y de mutagénesis asociada a la transcripción, se hace permanente en forma de mutaciones, rotura cromosómica e inestabilidad. La inestabilidad genómica promueve el cáncer y el envejecimiento.

En apoyo de un papel para el medioambiente en la modulación de la eficiencia en la capacidad de reparación del DNA, se ha emitido una pregunta: ¿mejora la dieta hipocalórica la estabilidad genómica aumentando la expresión/actividad de enzimas reparadores del DNA? (13). En otras palabras, es razonable proponer que el declinar, relacionado con la edad, en la capacidad de una célula u organismo para mantener la integridad de su genoma, es un mecanismo fundamental inherente al proceso del envejecimiento, estando la restricción dietética en el centro del retraso de la vejez y la prolongación de la vida mediante el mantenimiento de la integridad genómica. Esta hipótesis es atractiva porque la integridad del genoma es de vital importancia para una célula u organismo, porque el DNA está constantemente expuesto a agresiones exógenas y endógenas y porque el daño al DNA se ha asociado en sus últimas causas biológicas a mutaciones, cáncer y otras enfermedades asociadas a la vejez. Además, la integridad del DNA, mantenida por una serie de sistemas reparadores, es esencial para la supervivencia de las células y de los organismos. El acúmulo de daño al DNA en células somáticas fue propuesto al principio como un mecanismo básico en el

proceso del envejecimiento, emitiéndose la hipótesis que el acumulo de daño al DNA ocasionaba la inactivación de genes y la muerte celular. Esta hipótesis se extendió proponiéndose que el acumulo de DNA no reparado y las subsiguientes mutaciones en las células, son las causas que alteran la replicación y transcripción del DNA, que conducen al fenotipo senescente. Por consiguiente, si la expresión de proteínas esenciales se reduce o inhibe mediante alteraciones en el genoma, una célula puede perder su función y su viabilidad y ésta puede ser la primera causa del envejecimiento.

Estudios realizados en los últimos cincuenta años apoyan esta hipótesis al demostrar alteraciones relacionadas con la edad en el metabolismo, mutaciones y daño al DNA. Además, muchas de estas alteraciones están aceleradas en el síndrome de Werner, y en las enfermedades genéticas tales como los síndromes de Hutchinson, Gilford, Progeria y Cockayne, que muestran síntomas clínicos de envejecimiento prematuro e implican mutaciones en los genes de reparación del DNA. Curiosamente, la restricción calórica se ha demostrado que revierte gran parte de las alteraciones relacionadas con la edad en el daño/reparación del DNA y en las mutaciones. Existen muchos mecanismos por los que la integridad genómica puede resultar afectada: cambios en la activación de carcinógenos, elevada destoxificación de los carcinógenos, capacidad incrementada de reparación del DNA o una combinación de estos factores. La dieta hipocalórica es un buen modelo para prevenir el comienzo y retrasar la progresión de tumores espontáneos o inducidos por agentes químicos. La activación en la capacidad de reparación del DNA proporciona una explicación de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica observada en animales restringidos. La restricción calórica es una «intervención» que altera la activación de genes de respuesta al estrés específicos, enzimas clave de las vías de reparación del DNA, los cuales darán como resultado la activación de la capacidad reparadora del DNA. La mayor reparación del DNA reduce el daño al DNA y la frecuencia de mutaciones, lo cual ha de redundar en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

5. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

En levadura se ha encontrado que la restricción de alimento afecta dos vías que elevan la actividad enzimática de SIR2. Por una parte, se activa la expresión del gen *PNC1*, que expresa una proteína enzimática, la nicotinamidasasa, cuya misión es eliminar la nicotinamida de las células, convirtiéndola en ácido nicotínico, y eliminado con ello, la acción represora de la nicotinamida sobre la actividad de SIR2. De acuerdo con la idea que la restricción calórica supone para la célula una situación estresante que activa la supervivencia, la actividad de PNC1 se estimula también en caso de estresantes suaves como elevada temperatura o exceso de concentración salina. Una segunda vía inducida en levadura por la dieta hipocalórica es la *respiración*, la forma que tiene la mitocondria de generar energía mediante la producción de NAD^+ a partir del NADH. De aquí se deduce que elevando el cociente NAD^+/NADH se ejerce una profunda influencia en la actividad de Sir2.

El efecto protector de las sirtuinas en células individuales está siendo cada vez más evidente, pero, si los productos de estos genes son mediadores de los beneficios de la restricción calórica ¿cómo puede la dieta hipocalórica regular sus actividades y el ritmo de envejecimiento en un animal completo? Recientes investigaciones han demostrado que los niveles de NAD^+ se elevan en hepatocitos en condiciones de ayuno elevando así la actividad SIRT1. Entre las proteínas, SIRT1 actúa sobre un regulador importante de la transcripción genética denominado PGC-1 α (coactivador 1 alfa del receptor activado por los proliferadores de los peroxisomas), que causa cambios en el metabolismo de la glucosa e interviene en la biogénesis de las mitocondrias. De manera que SIRT1 actúa a modo de sensor de la disponibilidad de nutrientes y regulador de la respuesta hepática.

La mitocondria, la maquinaria energética de la célula, que genera ATP y especies reactivas de oxígeno (ROS), es muy susceptible al deterioro. Como la mayoría de los componentes celulares tienen que ser reciclados y regenerados a lo largo de la vida, se necesita el continuo recambio mitocondrial, lo cual se lleva a cabo mediante la *biogénesis mitocondrial* (14). La biogénesis de nuevas mitocondrias mantiene la producción de energía, previene del estrés oxidativo, y favorece el envejecimiento saludable. Células y tejidos ante la de-

manda de mayor cantidad de energía responden fabricando nuevas mitocondrias. La biogénesis mitocondrial está influenciada por condiciones fisiológicas y energéticas en continuo cambio. No es de sorprender que factores tales como la disponibilidad de nutrientes, ciertas hormonas, la temperatura, hipoxia, estrés y envejecimiento, ejerzan influencia en el proceso de la mitocondriogénesis. Los cambios dependientes de la energía celular afectan a la función y el número de las mitocondrias e implican una compleja disposición de factores que conectan los requerimientos de energía con la regulación genética. En la complejidad de la biogénesis mitocondrial intervienen más de 1.000 genes, la cooperación de los dos genomas (el mitocondrial y el nuclear) y la alteración del 20% de las proteínas celulares. En el núcleo, la regulación concertada de tantos genes requiere una serie de factores de transcripción capaces de orquestar la interacción del complejo RNA pol II con los varios promotores. Además de los genes nucleares, que codifican más del 95% de las proteínas mitocondriales, la mitocondriogénesis requiere la participación del genoma mitocondrial, que es el que genera la mayoría de las proteínas hidrofóbicas de la cadena de transporte electrónico y también el tRNA y rRNA mitocondriales.

A nivel molecular varios factores de transcripción y cofactores intervienen en la activación de vías señalizadoras inducidas por hormonas. Otro grupo de factores interviene en la adaptación metabólica al ayuno, como la familia de los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR) y el receptor X hepático que junto con PGC-1 α elevan la biogénesis mitocondrial y el catabolismo de los ácidos grasos. A pesar de la complejidad de las diversas vías señalizadoras, todas ellas parece que comparten un componente clave de la familia PGC-1 de cofactores de transcripción. El PGC-1 α actúa como mediador intracelular durante la biogénesis mitocondrial inducida por factores hormonales. La regulación, dependiente de SIRT1 de este coactivador del receptor nuclear se ha asociado a la biogénesis mitocondrial. La restricción calórica promueve la sensibilidad a la insulina con la consiguiente reducción de la glucosa y la insulina en sangre. Se ha asociado SIRT1 con el corregulador del receptor nuclear PGC1 α . Su importancia fisiológica se apoya en el hecho de que la represión de PGC-1 α por una forma mutante de la proteína Hungtintina produce disfunción mitocondrial y neurodege-

neración, mientras que la sobreexpresión de PGC-1 α rescata las células de los efectos deletéreos de la Hungtintina. La expresión de PGC-1 α está relacionada directamente con la actividad de la biogénesis mitocondrial. Muchos agentes y eventos regulan los niveles de PGC-1 α activando diferentes mediadores intracelulares (Figura 4).

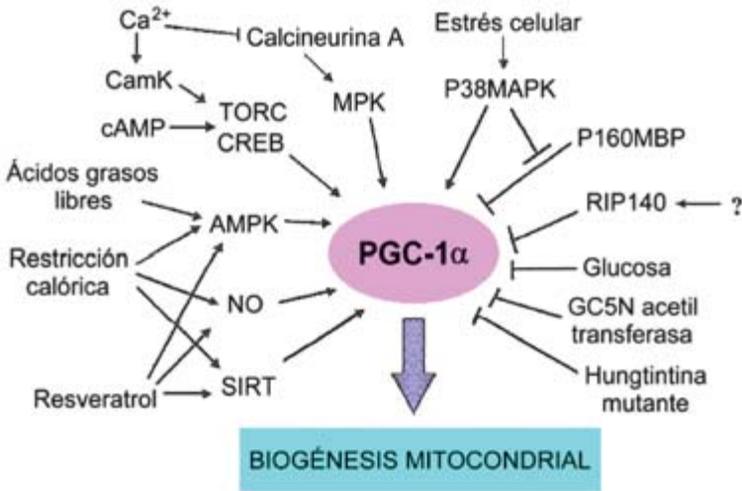


Figura 4. Red señalizadora que regula PGC-1 α . PGC-1 α es el centro de una red compleja de señales afectada por factores metabólicos, nutricionales y ambientales que modulan, por modificaciones transcripcionales y post transcripcionales, la actividad de PGC-1 α , y la biogénesis de la mitocondria (14).

La proteína SIRT1 como reguladora de la gluconeogénesis hepática reprime la función de los genes glucolíticos. Mediante la desacetilación de PGC-1 α , SIRT1 activa la transcripción de los genes gluconeogénicos mediante interacciones con el factor nuclear hepato-cítico 4 α , que se asocian con la represión de los genes glucolíticos. SIRT1 desacetila y activa a PCG-1 α en varios residuos de lisina e incrementa su capacidad de coactivar la transcripción de una serie de genes. Así, el incremento de SIRT1 durante la restricción calórica, interviene en la biogénesis de la mitocondria en tejidos tales como el músculo y tejido adiposo. También SIRT1 desacetila y activa la NOS (óxido nítrico sintasa), lo que indica que se establece un mecanismo «feedback» positivo entre la NOS y SIRT1, que puede reajustar los niveles de SIRT1 durante la restricción calórica.

Como se comentó anteriormente, SIRT1 actúa a modo de regulador positivo de PGC-1 α mediante su desacetilación. Una acetilasa, el complejo GCN5 acetiltransferasa es un factor implicado en la represión de PGC-1 α . La acetilación de PGC-1 α da lugar a una proteína transcripcionalmente inactiva. En la Figura 5 se muestra el esquema donde PGC-1 α al ser desacetilado por SIRT1 se une al receptor nuclear y promueve la expresión de genes mitocondriales y genes OXPHOX, además de otros. La activación de SIRT1 por la dieta hipocalórica implica la elevación de la concentración de NAD⁺. Según este esquema, el resveratrol, activa directamente a SIRT1.

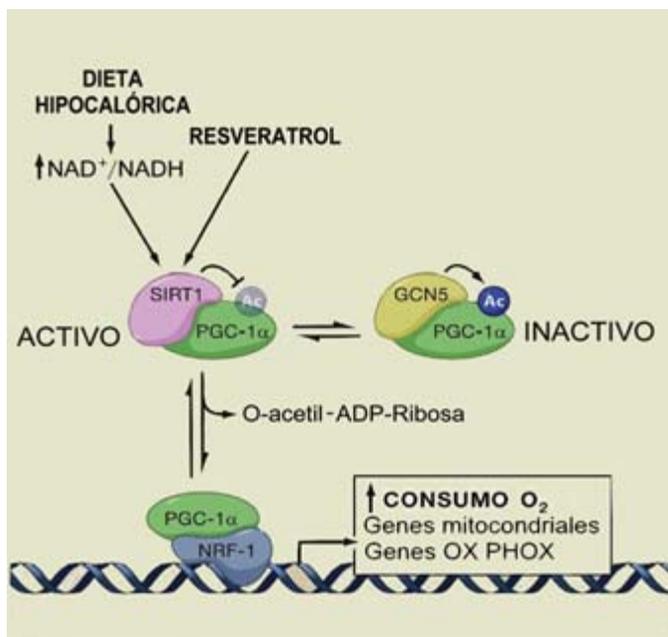


Figura 5. La dieta hipocalórica mediante la elevación del cociente NAD^+/NADH activa a SIRT1, que a su vez, desacetila y activa al coactivador de la transcripción PGC-1 α , el cual se traslada al núcleo y se une al factor nuclear (NRF-1) y activa la transcripción de genes mitocondriales y genes OXPHOX. La GCH5 acetil transferasa puede activar e inactivar a PGC1 α . El resveratrol tiene capacidad de activar directamente a SIRT1 (14).

6. HOMEOSTASIS DE LA INSULINA Y LA GLUCOSA

Si las sirtuinas son las proteínas que gobiernan el control de un sistema regulador del envejecimiento y se activan en situaciones de estrés, han de funcionar también como conductoras de una orquesta que incluye redes hormonales, proteínas reguladoras y otras proteínas codificadas por genes de longevidad. Uno de los descubrimientos recientes más notables es que SIRT1 regula la producción de *insulina* y del *factor insulínico* (IGF-1) y que estas dos poderosas moléculas señalizadoras regulan, a su vez, la producción de SIRT1. La relación entre SIRT1, IGF-1 e insulina explica como la actividad SIRT1 en un tejido puede comunicarse con otras células del organismo. Además, los niveles circulantes de insulina e IGF-1 dictan la expectativa de vida en los diversos organismos antes citados.

Un componente crítico de la fisiología de la dieta hipocalórica es la sensibilidad a la insulina y la correspondiente disminución en los niveles sanguíneos de glucosa e insulina. Las células β pancreáticas ayudan a la homeostasis de la glucosa secretando insulina en respuesta a glucosa. El metabolismo de la glucosa por glucolisis, genera piruvato, el cual entra en la mitocondria donde se convierte en CO_2 por el ciclo tricarboxílico. El NADH generado en este ciclo conduce el transporte electrónico y la síntesis de ATP. El incremento del cociente ATP/ADP produce el cierre de los canales KATP y despolariza la membrana plasmática lo que conlleva a un influjo de Ca^{2+} que desencadena la fusión de las vesículas secretoras que contienen insulina, en la membrana celular. Se ha demostrado en ratón que SIRT1 regula positivamente la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β pancreáticas. Por tanto, SIRT1 reprime la transcripción de la proteína mitocondrial UCP-2 (*uncoupling proteína-2*), que desacopla la respiración mitocondrial de la producción de ATP y reduce el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial. Así, bloqueando la función de UCP-2, SIRT1 promueve la generación de energía de manera más eficiente. Por otra parte, la represión de UCP-2, mediada por SIRT1, se aminora por privación aguda de alimento, la cual afecta la síntesis de ATP y la respuesta de la insulina de las células β durante el ayuno. Aunque la concentración de SIRT1 no se afecta por esta condición hipocalórica, existe una disminución en el cociente NAD^+/NADH , que reduce la actividad SIRT1 en páncreas. La presen-

cia de UCP-2 en animales ayunados, puede también facilitar la transición a la actividad metabólica después del siguiente alimento y prevenir la hiperpolarización de la membrana mitocondrial y la producción de ROS. Aunque estos estudios demuestran que la actividad SIRT1 disminuye en células β durante el ayuno, no se sabe si SIRT1 regula la secreción de insulina durante la dieta hipocalórica o juega algún papel en las patologías que demuestran alterada secreción de insulina.

Existe la posibilidad que SIRT1 promueva la supervivencia de las células β pancreáticas durante el estrés oxidativo. En células β estresadas, la proteína forkhead FOXO1 se traslada al núcleo donde activa los factores de transcripción que proporcionan resistencia al estrés. Como se describió anteriormente, SIRT1 se une y regula a los factores de transcripción forkhead negativa y positivamente. Se ha demostrado que SIRT1 desacetila a FOXO1 y la activación de esta proteína proporciona resistencia al estrés.

El mecanismo principal que se encuentra implicado en el efecto anti envejecimiento es la baja actividad GH/IGF1 y la respiración mitocondrial más eficiente, que ejerce sus efectos beneficiosos por la menor generación de ROS. Otro factor importante asociado a la menor actividad GH/IGF1 es la mejora del *síndrome metabólico* (15), la causa principal de la morbilidad del envejecimiento, que se asocia entre otros, con una resistencia a la insulina y elevados niveles sanguíneos de glucosa y lípidos. Ratones con deficiente señalización insulínica tienen vida más larga. El concepto de mayor eficiencia metabólica, que se traduce en menor producción de ROS endógenos y mayor longevidad, puede aplicarse a la dieta hipocalórica y a la actividad NAD desacetilasa de SIRT1. La importancia reguladora de SIRT1 se traduce en la movilización de ácidos grasos en los adipocitos, producción de glucosa en los hepatocitos, secreción de insulina en las células β pancreáticas y oxidación de los ácidos grasos en músculo esquelético.

Por tanto, la actividad desacetilasa, dependiente del NAD, de las sirtuinas, se considera el mediador del incremento de la longevidad dependiente de la restricción calórica, que retrasa la vejez en todas las especies ensayadas. Las sirtuinas perciben la disponibilidad de nutrientes por mecanismos no totalmente conocidos, pero entre los que se incluye la abundancia del NAD, necesaria para la actividad

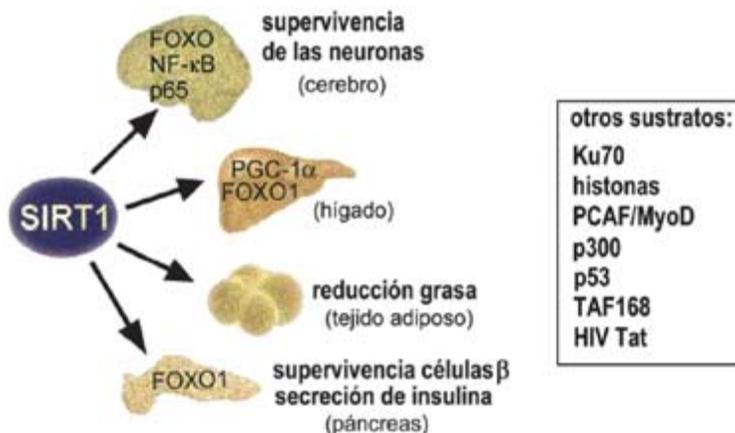


Figura 6. Regulación de procesos fisiológicos. SIRT1 regula la supervivencia de neuronas, la gluconeogénesis, la lipólisis, la supervivencia de las células β y la secreción de insulina [Modificado de (7)].

de SIRT1 y para la activación transcripcional del gen *Sirt1* por un complejo formado por el factor de transcripción Forkhead box y p53. En caso de escasez de nutrientes SIRT1 desencadena un programa metabólico mediado, en parte, por asociación de SIRT1 con el coactivador de la transcripción PGC-1 α , lo que da lugar a mayor eficiencia metabólica y a menor generación de ROS.

La familia de factores de transcripción FOXO, merece ser mencionada por su posible papel en la longevidad y protección frente al cáncer en respuesta a nutrientes. Las proteínas FOXO se activan en diversas situaciones de estrés, y en esta activación están implicadas la vía Jun quinasa, y su desacetilación por SIRT1. Por el contrario, FOXO se inactiva por factores de crecimiento, incluyendo a la insulina, a través de la quinasa AKT. Las proteínas FOXO activan la transcripción de muchos genes que codifican enzimas gluconeogénicos y enzimas antioxidantes (Figura 6).

En resumen, diversas manipulaciones genéticas (disminución en GH, IGF1 y receptor de la insulina, elevación de FOXO, SIRT1 y KLOTHO), e intervenciones anti envejecimiento (anti diabéticos, dietas hipocalóricas y resveratrol), comparten la capacidad de mejorar la eficacia metabólica reduciendo el ritmo de generación de ROS.

Existen evidencias contrastadas que indican que la mayor eficacia metabólica proporciona protección frente al cáncer (16). Los anti-diabéticos, las dietas hipocalóricas y el resveratrol previenen o retrasan varios tipos de cáncer en ratones. El resveratrol es un compuesto presente en numerosos nutrientes, que muestra notable actividad antienvjecimiento, aunque a concentraciones mucho más elevadas que las encontradas en los alimentos. El resveratrol estimula la actividad catalítica de SIRT1 y alarga la vida de la levadura, nematodos, moscas, peces y también de ratones alimentados con dieta hipercalórica elevada en grasa.

7. RESVERATROL

La restricción calórica (nutrientes sí, calorías no) supone consumir menos de 1.750 calorías diarias, lo cual puede en algunos momentos resultar difícil. Para vivir más y no sufrir los achaques de la vejez hay que restringir la dieta, pero... ¿podrán inducirse las sirtuinas sin necesidad de restringir la ingesta? Si los humanos quieren conseguir los beneficios de la restricción calórica, una dieta radical no es una opción razonable, así que, en el momento presente se está intentando encontrar el modo de activar las sirtuinas sin necesidad de recurrir a dietas hipocalóricas. Existen ya fármacos que pueden modular la actividad de las sirtuinas de una manera similar a la dieta hipocalórica. Se ha demostrado que es particularmente interesante un compuesto activador de la sirtuina, el *resveratrol*. El resveratrol es una fitoalexina presente en uvas negras y en el vino tinto, mosto, nueces, etc., cuya fórmula, *trans* 3, 5, 4' trihidroxi estilbeno lo caracteriza como componente fenólico de la familia flavonoides. Se sintetiza por una variedad de plantas cuando sufren situaciones de estrés. Se han encontrado muchos otros compuestos de origen vegetal que también modulan la expresión de las sirtuinas tales como los flavonoides. El resveratrol se comercializa como extracto de la raíz del *Polygonum cuspidatum* (Figura 7).

El resveratrol posee propiedades antioxidantes anticancerígenas, antiinflamatorias, reduce la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Es también un antiagregante plaquetario y anti-diabético, y previene enfermedades degenerativas.



Figura 7. A la **izquierda** la estructura de la molécula de resveratrol: trans 3,5,4' trihidroxi estilbeno. A la **derecha** el *Polygonum cuspidatum*.

La función disminuida de la mitocondria en lo que se refiere a la fosforilación oxidativa y la capacidad aeróbica, se asocian con la reducción de la longevidad. El impacto del resveratrol sobre la mitocondria ha sido estudiado y se ha comprobado que este compuesto eleva significativamente la capacidad aeróbica y el consumo de oxígeno en las mitocondrias de las fibras musculares de ratón. Los efectos obtenidos con el resveratrol se asociaron con la inducción de genes de la fosforilación oxidativa (OXFOS) y con los implicados en la biogénesis mitocondrial (17). Estos efectos se explican por la disminución mediada por el resveratrol, de la acetilación e incremento de la actividad del coactivador PGC-1 α (18) (Figuras 5 y 6). Este mecanismo es consistente con el efecto, anteriormente mencionado, que el resveratrol es un activador de la SIRT1. Además el tratamiento con resveratrol protegió a los ratones de la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina (19). La administración de resveratrol a levadura, gusanos o moscas, o las dietas hipocalóricas alargan su longevidad en un 30%, pero sólo si estos organismos poseen el gen *SIR2*. Además, una mosca que superproduce *SIR2* tiene una mayor longevidad, que no puede ser posteriormente alargada por resveratrol o restricción calórica. La interpretación más simple es que tanto la dieta hipocalórica como el resveratrol prolongan la vida de las moscas de la fruta al activar *SIR2*. Las moscas alimentadas con resveratrol no sólo viven más, a pesar de comer *ad libitum*, sino que no padecen reducción de fertilidad causada a menudo por la restricción calórica. Esta es una

buena noticia para aquellos que esperan tratar las enfermedades humanas con moléculas que activan los enzimas SIR2.

Dadas las propiedades del resveratrol, como mimético de la dieta hipocalórica, la empresa, Sirtris Pharmaceuticals cofundada por Sinclair, empezó las pruebas clínicas con un activador de SIRT1 la molécula SRT501, derivada del resveratrol. Recientemente Glaxo se ha hecho con este producto.

8. CONCLUSIONES

Los organismos multicelulares exhiben un declinar progresivo e irreversible de las funciones fisiológicas, que es característico de la senectud. Aunque las bases moleculares de este declinar no se conocen aún en su totalidad, los mecanismos hasta ahora propuestos incluyen una incremento en la generación de ROS y una progresiva acumulación de lesiones en el DNA, que van a dar lugar a inestabilidad genética y a alteraciones epigenéticas. Todo ello lleva consigo el deterioro oxidativo de macromoléculas críticas, la glicación de proteínas constitutivas y el acortamiento de los telómeros de células replicativas.

El mantenimiento de la actividad mitocondrial es un factor clave en la prevención de la progresión de enfermedades asociadas a la edad. La activación de los componentes reguladores de la biogénesis mitocondrial, principalmente el coactivador transcripcional PGC-1 α , emergen como un campo prometedor de investigación para tratar de ampliar la calidad de vida en la población anciana. El mantenimiento de un estilo de vida activo y una dieta moderada en calorías son el medio de mantener la actividad mitocondrial y la viabilidad celular a lo largo de la vida. El uso de agentes antioxidantes, tales como el resveratrol, puede afectar positivamente el envejecimiento saludable y promover la longevidad.

Por decenas de miles de años, uno de los sueños de la humanidad ha sido detener el envejecimiento lo cual se ha intentado sin éxito. Incluso hoy es difícil de aceptar que la edad pueda ser controlada manipulando una serie de genes, sin embargo, se sabe que es posible prevenir los achaques de la vejez con un simple cambio en la dieta, y también que los genes que codifican las sirtuinas controlan las

mismas vías moleculares que la dieta hipocalórica. Sin que se conozcan la multitud de causas precisas del envejecimiento, ya se ha demostrado en una amplia variedad de formas de vida que los efectos adversos de la edad pueden ser retrasados manipulando unos pocos reguladores, que una vez activados van a cuidar de la salud del organismo y promover la longevidad.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
2. Santos-Ruiz, A. & Cascales, M. (2000) Restricción calórica, en *Alimentos y Salud* (Ed. Bernabé Sanz Pérez), Real Academia Nacional de Farmacia, pp. 413-453.
3. Sinclair, D. A. & Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles-A cause of aging in yeast. *Cell.* 91: 1033-1042.
4. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M. & Gaurent, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 403: 795-800.
5. Lin, S. J., Defossez, P. A. & Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by caloric restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 289: 2126-2128.
6. Chen, D. & Guarente, L. (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol. Med.* 13: 64-71.
7. Haigis, M. C. & Guarente, L. (2006) Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging and calorie restriction. *Genes & Dev.* 20: 2913-2921.
8. Insúa, M. & Fuks, K. Restricción calórica: una revisión www.nutrinfo.com.ar.
9. Imai, S. (2007) Is Sirt a miracle for longevity? *Aging Cell.* 6: 735-737.
10. McCay, C. M. & Crowell, M. F. (1934) Prolonging the life span. *Sci Month.* 39: 405-414.
11. Masoro, E. J. (1990) Assesment of nutritional components in prolongation of life and health by diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193: 31-34.
12. Pamplona, R. & Barja, G. (2006) Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionina connection. *Biophys. Biochim. Acta.* 1757: 496-508.
13. Heydari, A. R., Unnikrishnan, A., Ventrella Lucente, L., & Richardson, A. (2007) Caloric restriction and genomic stability. *Nucleic Acids Research.* 35: 7485-7496.
14. López-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P. & de Cabo, R. (2008) Mitochondrial biogenesis and health aging. *Exp. Gerontol.* 43: 813-819.
15. Guarente, L. (2006) Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature.* 444: 868-874.

16. Greer, E. L. & Brunet, A. (2005) FOXO transcription factors at the interface between aging and tumor suppression. *Oncogene*. 34: 7410-7425.
17. Guarente, L. (2008) Mitochondria- A nexus for aging, calorie restriction and sirtuins. *Cell*. 132: 171-176.
18. Lagouge, M., Argman, C., Gerhart-Hines, Z. *et al.* (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC1 α . *Cell*. 127: 1109-1122.
19. Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L. *et al.* (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high calorie diet. *Nature*. 444: 337-342.

Otra bibliografía consultada

- Ahmed, N. & Thornalley, P. J. (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes. Metab.* 9: 233-245.
- Berger, J. L., Kayo, T., Vann, J. M. *et al.* (2008) A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retard aging parameters in mice. *PLoS ONE*. 3, e2264: 1-10.
- Bordone, L. & Guarente, L. (2005) Calorie restriction, SIRT-1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 6. 298-305.
- Bordone, L., Mota, M. C., Picard, F. *et al.* (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biol.* 4, e31.
- Cantó, Ch. & Auwerx, J. (2008) Glucose restriction: Longevity SIRTainly, but without building muscle? *Dev. Cell*. 14: 642-644.
- Hipkiss, A. R. (2008) Energy metabolism, altered proteins, sirtuins and ageing: converging mechanisms? *Biogerontology*. 9: 49-55.
- Lee, C.-K., Klopp, R. G., Weindruch, R. & Prolla, T. (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*. 285: 1390-1393.
- Longo, V. D. & Kennedy, B. K. (2006) Sirtuins in aging and age related disease. *Cell*. 126: 257-268.
- Qin, W., Wang, T., Ho, L. *et al.* (2006) Neuronal SIRT 1 activation as a novel mechanism underlying prevention of Alzheimer's disease amyloid neuropathy by calorie restriction. *J Biol Chem*. 28: 21745-21754.
- Revollo, J. R., Grim, A. A. & Imai, S. (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Cell*. 279: 50754-50763.
- Rodgers, J. T., Lenin, C., Haas, W. *et al.* (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α y SIRT1. *Nature*. 434: 113-118.
- Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. & Boeke, J. D. (2007) The biochemistry of sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 435-465.
- Sinclair, D. (2005) Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126: 987-1002.
- Song, S., Pursell, Z. F., Copeland, W. C. *et al.* (2007) Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62: 427-433.

- Weindruch, R., Walford, R. L., Fligiel, S. & Guthrie, D. (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction: Longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr.* 116: 654.
- Westphal, C. H., Dipp, M. A. & Guarente, L. (2007) A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends Biochem. Sci.* 32: 555-560.
- Whittle, J. R., Powell, M. J., Popov, V. M. *et al.* (2007) Sirtuins, nuclear hormonal receptor acetylation and transcriptional regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 356-364.

Abreviaturas

AKT, quinasa; **AMPK**, proteína quinasa activada por AMP; **CRE**, elemento de respuesta al cAMP; **CREB**, factor de transcripción que se une a CRE; **ERC**, círculos extracromosómicos; **FOXO**, factor de transcripción; **GH**, hormona del crecimiento; **IGF1**, factor insulínico; **NFκB**, factor nuclear kappa B; **NAD⁺**, nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; **NADH**, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; **Nampt**, nitotinamida fosforibosil transferasa; **NO**, óxido nítrico; **p53**, proteína supresora de tumores; **OXPPOS**, fosforilación oxidativa; **P160MBP**, proteína que se une a myb, un represor de PGC-1α; **PGC1α**, coactivador transcripcional de genes nucleares; **PNC1**, nicotinamidasa, proteína que elimina la nicotinamida convirtiéndola en ácido nicotínico; **rDNA**, DNA ribosómico; **RIP140**, proteína que interacciona con receptores nucleares, represora de PGC-1; **SIRT**, sirtuinas de mamíferos, desacetilasas dependientes del NAD; **UPC**, proteína desacoplante mitocondrial.

* Información de contacto:

Doctora María Cascales Angosto.

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Email: mcascales@insde.es

(Cu)II *in vivo* interaction with cefotaxime

Antonio L. Doadrio^{1*}, Pilar Madrigal², Juan de Dios Casas²

¹ Department of Inorganic Chemistry and Bioinorganic. School of Pharmacy. University Complutense. Madrid. Spain.

² Dirección Department of Toxicology and Legal Medicine. School of Medicine. University Complutense. Madrid. Spain.
Recibido el 9 de diciembre de 2008.

ABSTRACT

The presence of Cu(II) in penicillin and cephalosporin solutions, has been proved, to promote *in vitro* the antibiotic degradation to the corresponding acid derivates. HPLC studies provided an additional evidence for the reaction mechanism. The mechanisms of Cu(II) catalysis involve a ternary complex. This work was undertaken to study the consequences of this degradation *in vivo* upper the pharmacokinetic, pharmacodynamic and activity of the antibiotic cefotaxime. It is one of the most used «third-generation» cephalosporin in the world, this is because of that the interaction cefotaxime-metal deserved our attention. Our results remarked a lower concentration of free cefotaxime in blood, liver, spleen, kidney, lung and heart in organs from animals suffering Cu-intoxication. The differences more significant between intoxicated and control rats were observed in liver, lung and kidney. In addition cefotaxime linked to copper lose most of the microbicidal activity against bacterial strains of *Bacillus subtilis* CECT 356, *Escherichia coli* CECT 434, *Escherichia coli* CECT 616, *Staphilococcus aureus spp aureus* CECT 435, *Staphilococcus aureus spp aureus* CECT 239, in plate tests. It means that cefotaxime would become ineffective as antibiotic in metal poisoned patients.

Key words: Copper(II); Cefotaxime; Pharmacodynamic; Pharmacokinetic; HPLC.

RESUMEN

Interacción *in vivo* del Cu(II) con cefotaxima

Este trabajo estudia la reacción del cobre II con una cefalosporina, la cefotaxima, *in vivo*; los mecanismos catalíticos que implican la presencia de complejos ternarios, su farmacocinética y su farmacodinamia que afectan a la actividad del antibiótico. Las diferencias más significativas entre las ratas intoxicadas y control fueron observadas en riñón, pulmón e hígado. También hemos estudiado la actividad microbiciada en *Bacillus subtilis* CECT 356, *Escherichia coli* CECT 434, *Escherichia coli* CECT 616, *Staphylococcus aureus spp aureus* CECT 435, *Staphylococcus aureus spp aureus* CECT 239.

Palabras clave: Cobre(II); Cefotaxima; Farmacodinamia; Farmacocinética; HPLC.

1. INTRODUCTION

The transition metal interactions to penicillins (1-5) and cephalosporins (6) were studied previously by spectrophotometric and potentiometric methods. In the case of cefotaxime, as impurity, also for HPLC (7).

In those studies it was observed that the effect of Cu(II) on the penicillins and cephalosporins was to promote their degradation to coordination complexes of Cu(II) and the corresponding penicilloic and cephalosporanic acids, (see Figure 1). Other authors have studied the formation of the complex *in vitro* between Cu(II) and penicillins and cephalosporins, by means of the reaction mechanisms, evaluating the stability constants for the interaction between Cu(II) and these antibiotics (2, 6).

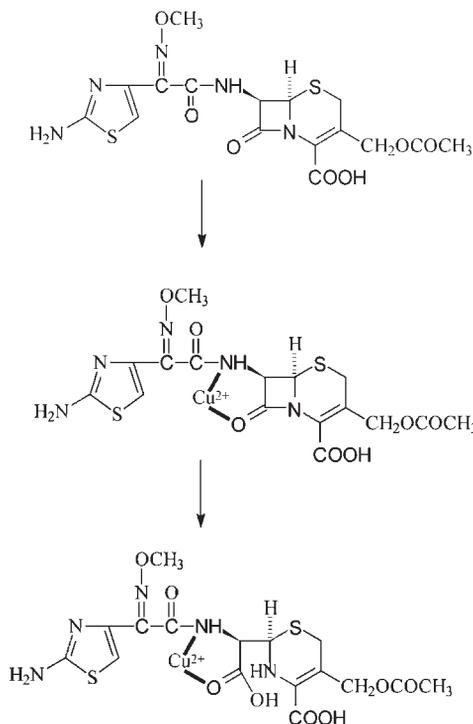


Figure 1. Mechanism of the hydrolytic reaction of Cefotaxime with addition of Copper.

This communication stresses in how the formation of the complex between Cu(II) and cefotaxime affects on the concentration, distribution and stability of this cephalosporin. The importance of the formation of this complex stems from the lowest concentration of free cefotaxime in blood and organs only when takes place intoxication. This free-antibiotic concentration could be lower than the administration of the antibiotic required killing the micro-organism that causes the infection.

We compared the concentration, distribution and stability of the free cefotaxime in rats without toxic with poisoned rats, after 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min. after administrating this antibiotic. This comparison was achieved by measuring the concentration of free cefotaxime in blood, liver, spleen, kidney, lung and heart homogenates of poisoned rats and rats without the toxic. The

methodology applied for this purpose was HPLC since this technique facilitates the separation of the complex Cu(II)cefotaxime, the corresponding Cu(II)-cephalosporanic acid chelate, free cefotaxime and their compounds resulting from the degradation of cefotaxime.

This paper is also focused on how much microbial activity contains the compounds produced from the complexation metal-cefotaxime. In pursuit of that aim, we studied the biological activity of the complexes against *Bacillus subtilis* CECT 356, *Escherichia coli* CECT 434, *Escherichia coli* CECT 616, *Staphilococcus aureus spp aureus* CECT 435 and *Staphilococcus aureus spp aureus* CECT 239 compared to data from experiments with free cefotaxime and Cu(II) at physiological concentrations found in poisoned living beans.

This work should be a clue to reveal whether the complex antibiotic-metal loses the microbiological activity as would be hypothesised by former works done in *in vitro* conditions.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Biology materials

Seventy five Wistar rats males of 250 to 300g weight were used throughout this work and supplied by the warehouse of the Complutense University of Madrid.

Animals were maintained in one of the rats room of the warehouse. The temperature was 20 °C, the relative humidity was 55% and the intensity of the light inside the room was 400 LUX using cycles of 12 hours of light/darkness.

Animals were distributed by groups in order to assay different treatments. One group of 35 rats with copper (group A), which was poisoned with a nasogastric sound administering to their everyday 4 mL of a solution of 4 mg/mL of a copper (II). monohydrate. acetate during 8 days. The groups left were arranged one of them with 35 rats (group B), and the other one with 5 rats (group C), both of them without metal.

Groups A and B were put under treatment with an intramuscular administration of an only dose of 200 mg of cefotaxime.

Group C was used as a control to know the different substances which belonged to the animals in order to not to be confusing with the free cefotaxime throughout the study.

Five rats of the groups A and B, were sacrificed after 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 minutes after the antibiotic administration. The blood, liver, spleen, kidney, lung and heart of those rats were extracted and after that, they were measuring their free cefotaxime concentration by HPLC.

Residual microbicide activity was tested by antibiogram experiments in agar plates using bacteria strains from the CECT (Spanish Type Culture Collection, Burjasot, Spain). Those strains were *Escherichia coli* CECT 434 = ATCC 25922, described as standard for sensibility, *Escherichia coli* CECT 616 = ATCC 8739, described for assays with liquid with metal, *Staphylococcus aureus spp aureus* CECT 435, *Staphylococcus aureus spp aureus* CECT 239 = ATCC 6538 and *Bacillus subtilis* CECT 356 = ATCC 6633 as «a priori» negative control since the species was not listed among the affectable bacteria by cefotaxime.

The strains were maintained in TSA media at refrigeration teemperature and precultured in tubes with 10 mL TSB medium at 37 °C for 24 hours before the experiments.

2.2. Chemical and reagents

Cefotaxime sodium was supplied by the Teaching Hospital of Madrid. Copper (II) acetate was obtained from Merck. Trichloracetic acid was supplied by Scharlau, this substance was used in concentrations of 10% and 20%.

The mobile phase reagents used were HPLC grade methanol from Scharlau. Water used was from a Milli-Rho-Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Phosphate buffer (0.1 M) was prepared with phosphate monopotasic anhydride and o phosphoric acid supplied by Merck.

The agar media used were TSA, a general bacterial growth media, and blood agar, both cooked as recommended the Merck's recipes.

2.3. Apparatus and instrument

Kontron high-pressure liquid chromatograph equipped with a Kontron 420 pump. An automatic injector with 6 valves Kontron Auto Sampler 460. A variable-wavelength UV detector of Kontron Uvikon 735 LC. Phenomenex C18 column (25 x 0.46 cm), filled with particles of 5 μ m, besides this column of separation, a precolumn and a protective column filled with the same material that the first column were used. A Kontron Station Data with D450 software was used to control the detector and injector, on the other hand it allowed the integration of the chromatogram peaks and it quantified the results.

Paper Whatman discs, discs AA of 7 mm diameter were used to absorb the antibiotic solutions in the agar-plate experiments.

2.4. Analytical procedure

The extraction of cefotaxime in blood was carried out by means of protein precipitants in 10% trichloroacetic acid (8) 1.5 mL of this reagent was added to 0.5 mL of blood. This mixture was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatant was collected through a Pasteur pipet and filtered through MFS disks of nylon of 0.4 mm of diameter. The clean supernatant was assayed by HPLC.

The extraction of cefotaxime in organs such as liver, spleen, kidney, lung and heart, was carried out by means of trichloroacetic acid 20%. 2 mL of this reagent were added to 0.5 g of dry weight of each organ. Each mixture was done homogeneous and was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was collected through a Pasteur pipet and filtered through MFS disks of nylon of 0.4 mm of diameter. It was later assayed by HPLC.

Isocratic HPLC conditions used along this work were: the mobile phase consisted of a 20:80% solution (v/v) of methanol in 0.01 M $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. The pH of the final solution was adjusted to 3.2 with phosphoric acid. The flow rate was 1 mL/min. Chromatograph was loaded with 40 μ L of each sample. Chromatograms were run at room temperature. Samples were detected at 254 nm.

The susceptibility tests were as follows: One loop of each of the precultured strains was spread on to the whole surface of agar-plates. Immediately after the inoculation paper discs soaked with 20 μ L of the assays solutions were placed on to the agar media. The plates were kept in the fridge for 30 minutes to allow the liquid diffusion through out the agar media while the bacterial growth was arrested. Finally the plates were cultured for one day at 37 °C and the microbicide effect of the solutions were measured by the size of the diameter of the growth inhibition zone (GIZ) surrounding each disc.

The assayed liquids were: free metal, free cefotaxime and the complex metal-antibiotic.

Standard solutions of free cefotaxime was prepared based on the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) reported in literature (9), being the solutions 5 times over the MIC of each species: *for S. aureus spp aureus* and *E. coli*, the MICs were 3.3 μ M and 0.12 μ M respectively. In the assays with *B. subtilis*, since it was assumed to be insensitive to the antibiotic, the mother solution was as *in S. aureus spp aureus*.

The highest concentrations of free metal assayed dissolved in water wee 5 times the maximum amount of Cu(II) found by us in poisoned rats (10). The source of Cu(II) was obtained from the acetate monohydrate salt at 44 μ M.

To measure the activity of the complex antibiotic-metal was necessary one previous procedure to isolate the antibiotic bounded to copper. Free antibiotic and the metal salt were dissolved together at saturation, 0.4 M for both components, at room temperature to promote the complexation reaction. The complex was separated from the residual contamination by chromatophy in a HPLC column exactly as the conditions as we identified the free cefotaxime in rats. The chromatografied buffer containing the complex was collected in 1.5 ml eppendorfs.

The resulting complex was dissolved in a methanol buffer. To prevent the methanol toxicity, the alcohol was removed by dissecation in a vacuum trap. The final power debris was weighted, resuspended in water at saturation, homogenized and pooled. The dry amount of the complex antibiotic-Cu was 90 mg. We assumed all the dry weight to be the complex since the phosphate coeluted from the isolation buffer was negligible (5 μ g).

The aqueous complex was prepared extemporarely at room temperate yielding 0.66 M cefotaxime-Cu final concentration. The assays were done with this concentration and four other more diluted in water.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Concentration of cefotaxime

The concentration homogenates of free cefotaxime was measured in blood, liver, kidney, spleen, lung and heart of the killed rats from groups A and B at the 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min. after the administration of cefotaxime. As there were 5 rats by each time, the average concentration of free cefotaxime was calculated by each group of 5 rats that were killed at each time.

Free antibiotic was present in all of samples showing a peak after 30 min of the administration the highest concentration of cefotaxime was found in blood (four order of magnitude more cefotaxime than the solid organs).

After the first 30 min, the antibiotic concentration dropped from the maximum to the minimal values reached after 3 hours and half of the beginning of the experiment.

The declining plots depicted a «two-phase» kinetic, inespctively of the group of rats or the organ source of the samples, in good agreement with the conclusion of the decrease of free antibiotic found in adult humans with normal renal function (11, 12).

In the first 30-90 min cefotaxime disappeared from the sample slowly, afterwards the declining late accelerated.

We can establish conclusive results describing that the amount of antibiotic is much higher in control rats than in copper-toxified rats.

The differences more significant have been seen in liver, kidney and lung. In spleen and heart, those differences were less prominent, although they are very appreciable. In blood, concentrations of free cefotaxime were greater in rats without copper, but the differences between concentrations are not as rough as in the others samples

that have been analysed. So, the presence of copper is an influential factor in the concentration of free cefotaxime.

This observation has been supported with the help of a statistical analysis, here the means of concentrations of free cefotaxime, in blood, liver, spleen, lung, heart and kidney of rats without copper and of the rats with it, at 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min. after administration of this cephalosporin, have been compared. This comparison has been done by means of a T distribution with $p < 0.05$.

Therefore, in all those times is dismissed the nule hypothesis and the averages differences of cefotaxime concentrations were statistically significant. As deduced from these differences between the free cefotaxime concentration in rats with and without copper did not happen randomly, so those differences in the concentration could be due to the formation of antibiotic/metal complex, remaining a lesser concentration of free cefotaxime.

3.2. Distribution of cefotaxime

Tables 1 and 2 show the greatest concentration of cefotaxime in blood. In the assayed organs the concentration of this cephalosporin is decreasing in the sense: Kidney > liver > lung > spleen > heart. Therefore cefotaxime is mainly stored in kidney. This fact happened in both groups, so we induced, the metal is not an influential factor in the distribution of cefotaxime.

Table 1. Average concentrations (mg/mL) of free cefotaxime in rats without copper

SAMPLES	TIME (MIN)						
	30	60	90	120	150	180	210
BLOOD	0.80	0.46	0.25	0.14	0.08	0.06	0.02
LIVER	$6.03 \cdot 10^{-5}$	$2.68 \cdot 10^{-5}$	$2.16 \cdot 10^{-5}$	$1.71 \cdot 10^{-5}$	$1.42 \cdot 10^{-5}$	$1.37 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-5}$
SPLEEN	$2.70 \cdot 10^{-5}$	$1.58 \cdot 10^{-5}$	$1.45 \cdot 10^{-5}$	$0.53 \cdot 10^{-5}$	$0.41 \cdot 10^{-5}$	$0.39 \cdot 10^{-5}$	$0.38 \cdot 10^{-5}$
KIDNEY	$24.2 \cdot 10^{-5}$	$18.1 \cdot 10^{-5}$	$10.6 \cdot 10^{-5}$	$5.90 \cdot 10^{-5}$	$5.01 \cdot 10^{-5}$	$4.81 \cdot 10^{-5}$	$3.17 \cdot 10^{-5}$
LUNG	$7.19 \cdot 10^{-5}$	$5.26 \cdot 10^{-5}$	$3.52 \cdot 10^{-5}$	$3.02 \cdot 10^{-5}$	$1.33 \cdot 10^{-5}$	$1.22 \cdot 10^{-5}$	$0.46 \cdot 10^{-5}$
HEART	$2.56 \cdot 10^{-5}$	$1.87 \cdot 10^{-5}$	$1.23 \cdot 10^{-5}$	$1.14 \cdot 10^{-5}$	$1.08 \cdot 10^{-5}$	$0.86 \cdot 10^{-5}$	$0.85 \cdot 10^{-5}$

Table 2. Average concentrations (mg/mL) of free cefotaxime in rats with copper

SAMPLES	TIME (MIN)						
	30	60	90	120	150	180	210
BLOOD	0.65	0.48	0.25	0.12	0.06	0.05	0.03
LIVER	$4.47 \cdot 10^{-5}$	$2.46 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-5}$	$0.88 \cdot 10^{-5}$	$0.84 \cdot 10^{-5}$	$0.61 \cdot 10^{-5}$	$0.25 \cdot 10^{-5}$
SPLEEN	$2.59 \cdot 10^{-5}$	$1.49 \cdot 10^{-5}$	$0.95 \cdot 10^{-5}$	$0.50 \cdot 10^{-5}$	$0.35 \cdot 10^{-5}$	$0.27 \cdot 10^{-5}$	$0.23 \cdot 10^{-5}$
KIDNEY	$20.6 \cdot 10^{-5}$	$9.03 \cdot 10^{-5}$	$5.16 \cdot 10^{-5}$	$4.01 \cdot 10^{-5}$	$3.28 \cdot 10^{-5}$	$2.80 \cdot 10^{-5}$	$2.64 \cdot 10^{-5}$
LUNG	$3.93 \cdot 10^{-5}$	$3.46 \cdot 10^{-5}$	$2.57 \cdot 10^{-5}$	$2.16 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-5}$	$1.01 \cdot 10^{-5}$	$0.26 \cdot 10^{-5}$
HEART	$1.61 \cdot 10^{-5}$	$1.39 \cdot 10^{-5}$	$1.21 \cdot 10^{-5}$	$0.98 \cdot 10^{-5}$	$0.87 \cdot 10^{-5}$	$0.66 \cdot 10^{-5}$	$0.29 \cdot 10^{-5}$

3.3. Stability of cefotaxime

The decrease rate constants of the concentration of free cefotaxime in treated and control rats are of first-order, according to the best values of correlation coefficient. The absolute values of the logarithmic of the observed constants K are shown in Table 4, where the highest value of log K is in heart for the 2 groups of rats, therefore the cefotaxime is more stable in heart than in the others studied organs.

In rats without copper the stability of cefotaxime in organs is decreasing in the sense: heart and liver > kidney and spleen > lung. In rats with copper the stability is: heart > kidney > liver, spleen and lung.

In blood it was observed the lowest stability of cefotaxime in the 2 groups of rats.

Therefore the highest and lowest stability were unaffected by the presence of copper.

3.4. Activity of cefotaxime

It is not only important the presence of copper in the availability of cefotaxime, but also the presence of the metal results to be crucial in the effectiveness of the cephalosporin dosage administrated to the

animals because of the decrease of the free cefotaxime concentration due to the metal.

Table 3. Differences more significant in concentrations of free cefotaxime between rats with copper and without it

SAMPLES	TIME (MIN)	P	VALUE OF T
BLOOD	150	0.04	2.34
	30	0.02	2.7
	90	0.02	2.9
LIVER	120	$1.47 \cdot 10^{-4}$	6.73
	150	0.02	2.8
	180	$1.57 \cdot 10^{-3}$	4.68
	210	$6.36 \cdot 10^{-8}$	18.9
SPLEEN	90	$7.27 \cdot 10^{-3}$	3.57
	150	0.02	2.9
	180	$1.14 \cdot 10^{-4}$	6.98
	210	$2.50 \cdot 10^{-4}$	6.23
KIDNEY	60	$4.34 \cdot 10^{-4}$	5.74
	90	$1.12 \cdot 10^{-7}$	15.57
	120	5.10^{-4}	5.61
	150	$5.46 \cdot 10^{-3}$	3.77
	180	$4.88 \cdot 10^{-4}$	5.64
LUNG	30	$4.93 \cdot 10^{-5}$	7.86
	60	$1.39 \cdot 10^{-4}$	6.8
	90	$1.35 \cdot 10^{-3}$	4.8
	120	$5.46 \cdot 10^{-3}$	3.77
	180	0.04	2.45
	210	$1.28 \cdot 10^{-3}$	4.84
HEART	30	$6.39 \cdot 10^{-4}$	5.4
	120	$6.16 \cdot 10^{-3}$	3.68
	180	$8.72 \cdot 10^{-3}$	3.44
	210	$1.19 \cdot 10^{-6}$	12.9

Table 4. The absolute values of the logarithmic of the observed constant K

	RATS WITHOUT COPPER	RATS WITH COPPER
BLOOD	1.73	1.79
LIVER	2.16	1.86
SPLEEN	1.93	1.86
KIDNEY	1.93	1.93
LUNG	1.86	1.86
HEART	2.16	2.16

Copper would provoke a fall down of free cefotaxime to values even below of those corresponding to the MIC (minimum inhibitory concentration) to kill the microorganism that would cause the infection, so that the activity of cefotaxime will decrease or even the cephalosporin will not have activity in many cases. So, in poisoned patients with copper, it is very important to bear in mind this fact when they have to follow a course of treatment with Cefotaxime.

In order to determinate and compare the biological activity of the complex, it was necessary to know the impact in the cell viability of the free cefotaxime as well as the metal by it-self in the same experimental conditions.

Dissolved copper in media culture has not a deleterious effect at all on growing cells (data not shown) even a mM scale in the discs, concluding that if the complex had any biological activity, it should not be due to rests of metal in the complex.

The detailed results of the assays with cefotaxime are shown in Table 5 and 6.

Shocking the *B. subtilis* CECT 356 strain (Table 5), which was thought to be a not susceptible bacteria (1, 9), arose as the most sensitive strain to cefotaxime, much more that even the well known sensitive strains of *E. coli* used by us. However *B. subtilis* was not sorted out in the past among the cefotaxime targeted species, perhaps due to be not a clinical bacteria, we strongly ask to favour their use as standard in sensitivity tests in the future.

Table 5. Activity of cefotaxime against *B. subtilis* CECT 356 and *E. coli* CECT 434 and CECT 516

	Concentration of cefotaxime in Moles	Diameter of the halo in mm
<i>B. subtilis</i> CECT 356	16.5.10 ⁻⁶	47
	3.3.10 ⁻⁶	32
	1.65.10 ⁻⁶	33
	0.82.10 ⁻⁶	31
	0.33.10 ⁻⁶	25
	0.655.10 ⁻⁶	21
<i>E. coli</i> CECT 434	1.125.10 ⁻⁶	16
	0.062.10 ⁻⁶	16
	0.031.10 ⁻⁶	15
	0.012.10 ⁻⁶	12
<i>E. coli</i> CECT 516	0.655.10 ⁻⁶	22
	0.062.10 ⁻⁶	18
	0.031.10 ⁻⁶	16
	0.012.10 ⁻⁶	14

Table 6. Activity of cefotaxime against *S. aureus spp aureus* CECT 239 and CECT 435

Concentration of cefotaxime	Diameter of the halo in mm			
	TSA Media		Agar-blood Media	
	<i>S. aureus spp aureus</i> CECT 239	<i>S. aureus spp aureus</i> CECT 435	<i>S. aureus spp aureus</i> CECT 239	<i>S. aureus spp aureus</i> CECT 435
16.5.10 ⁻⁶	33	37	27	30
3.3.10 ⁻⁶	27	29	21	24
1.65.10 ⁻⁶	27	27	18	23
0.82.10 ⁻⁶	24	25	15	20
0.33.10 ⁻⁶	19	23	12	17

As expected, cefotaxime was active against *E. coli* studied (Table 5), but some differences would be observed: strikingly *E. coli* CECT

434, described as standard of sensitivity likely was less affected than *E. coli* CECT 516, used in resistance to metals.

In the *S. aureus spp aureus* cultures, two different media were used: TSA and blood agar. The later provided an environment similar in somewhat manner to the mammalian tissues, because is a protein-rich medium containing cellular rests. cefotaxime was effective against those strains of *S. aureus spp aureus*, but the sensitivity was increased in the TSA cultures. It could be justified because an antibiotic sequestration by protein binding occurred in the blood agar medium. cefotaxime is reported to bind proteins, so the amount of free antibiotic would be 27-38% reduced in the presence of proteins (11). It means that the amount of functional antibiotic was lesser in the blood agar. Our findings agreed the reported data, because the GIZ in blood agar had mean values 25% smaller than in TSA cultures.

As observed in *E. coli*, the two strains assayed did not show the same results regarding the level of sensitivity to cefotaxime. However the experimental results were not enough to build statistical analysis, it seemed, comparing the data of the *E. coli* and *S. aureus spp aureus* strains, that the intensity of the antibiotic aggression could have a strain dependent component in each of the sensitive species.

As above mentioned, the importance of this work is to know whether the complex, antibiotic-metal has biological activity against the strains of microorganisms studied.

The cefotaxime-copper complex (Table 5) had some activity against *B. subtilis* CECT 356 and *E. coli* CECT 516 only at the highest concentration used, being harmless at lower concentrations.

The results would induce misleading conclusions. Apparently, there was a moderate microbicide activity against the model species, but a matter of scale should be addressed. cefotaxime was fully active at μM concentrations or lower, whereas the complex derivate required a concentration six orders of magnitude higher to affect slightly the cell viability. The maximum concentration *in vivo* of cefotaxime reported in adult patients with a normal renal function is 55 μM (1,11), so the microbicide effect of the complex lacked of a practical relevance in physiological terms.

Finally, we wish to warn about the clinical outcome of our finding: antibiotic treatment based on cefotaxime in copper poisoned patients

with a bacterial sickness would be completely counterproductive, because the infecting microorganisms could progress without opposition.

4. REFERENCES

1. Doadrio, A. L., Sotelo, J. B., Doadrio, J. C., Orenga, R. & Mayorga, A. (1994) Toxic-ions catalyzed hidrolisis of Amoxicillin: HPLC Kinetic studies. *Ecl. Quim.* 19: 37-47.
2. Cressman, W. A., Sugita, E. T., Dohisio, J. T. & Niebergal, P. J. (1996) Cupric ion-catalyzed hidrolisis of Penicillins: Mechanism and site of complexation. *J. Pharm Sci.* 58: 1471-6.
3. Doadrio, A. L., Doadrio, J. C. & Iribarren, M. (1992) Metal-ions catalyzed hydrolysis of Ampicillin: RPHPLC-IEXHPLC Kinetic studies. *Ecl. Quim.* 17: 41-52.
4. Doadrio, A. & Mirasierra, M. G. (1969) Determinación espectrofotométrica de la Ampicilina como quelato cúprico. *An. Real. Acad. Farm.* 35: 115-31.
5. Doadrio, A. & Mirasierra, M.G. (1973). Determinación espectrofotométrica de la Metampicilina como complejo cúprico. *An. Real. Acad. Farm.* 39: 183-91.
6. Mayorga, A. (1999) Interacción de metales tóxicos con Ceftriaxona: Complejos con Cu y V. Unpublished master's thesis, University Complutense, Madrid, Spain.
7. Chi-Hua, S. & Hui-Po, W. (1988) Methods in the preparation of D-Phenylglycine containing cefotaxime. *J. Food and Drugs Anal.* 6: 477-484.
8. Blanchard, J. (1981) Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid Chromatographic analysis. *J. Chromatogr.* 226: 455-60.
9. Jones, R. N. (1995) Cefotaxime and desacetylcefotaxime antimicrobial interactions the clinical relevance of enhanced activity: a review. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22(1-2): 19-33.
10. Madrigal, P. (1999) Estudio *in vivo* de la interacción de Cobree y Vanadio con Cefotaxima. Unpublished master's thesis, University Complutense, Madrid, Spain.
11. Patel, K. B., Nicolau, D. P., Nightingale, C. H. & Quintalini, R. (1995) Pharmacokinetics of Cefotaxime in healthy volunteers and patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 49-55.
12. Drug Informat American Hospital Formulary Service (AHFS). 92-124.

* Información de contacto:

Doctor Antonio L. Doadrio Villarejo.

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. UCM. Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040. Madrid. España.

Telf: 91 394 17 89. Fax: 91 394 17 86

Email: antonio@ranf.com

SESIÓN NECROLÓGICA

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada

Sesión celebrada el 5 de marzo de 2009.



El Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada nació el 26 de agosto de 1933 en Burgos. Tomó posesión como Académico de Número el día 14 de noviembre de 1991. Falleció el 9 de septiembre de 2008. La Sesión Necrológica se celebró el día 5 de marzo de 2009. En dicha sesión participaron el Excmo. Señor Don César Nombela, Académico de Número; Don N. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número; el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio, Académico de Número, y la Excmo. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Juan Manuel Reol: Una época de la farmacia española

César Nombela Cano

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excma. Señora Presidenta,

Excmos. Señores y Señoras Académicos,

Señora viuda, hijos y familiares del Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada,

Señoras y Señores.

Agradezco a la sección VI de esta Real Academia el que me haya propuesto para intervenir en este acto. Ocasiones como esta deben servir para glosar la tarea de quienes nos han precedido en actuaciones y alcanzado éxito en función de su inteligencia y su compromiso. Hacerlo con objetividad y equilibrio resulta obligado cuando se trata de manifestaciones propias de un foro académico como éste. Mostrar la forma en que nuestros compañeros supieron ser creativos en un pasado reciente es también provechoso para las nuevas generaciones, que, en el presente y en momentos futuros no muy lejanos, se han de enfrentar a encrucijadas en las que hay que saber elegir. Y por último, pero no menos importante, hoy también es un día para demostrar los afectos hacia los más allegados a la figura de Juan Manuel Reol, su mujer, María Ángeles, y sus hijos, con quienes esta Academia comparte el dolor por su ausencia definitiva de este mundo, pero que igualmente quiere con ellos celebrar su vida, tantos años vinculada a los esfuerzos y tareas de esta corporación en la que llegó a desempeñar la Presidencia.

El título de mi intervención «Juan Manuel Reol: una época de la Farmacia española», quiere reflejar que es obligado hacer referencia a una serie de actuaciones, de nuestro recordado académico, en pro de la institucionalización de la gestión pública de los asuntos que conciernen al medicamento y a todo el entorno profesional farma-

cético en nuestro país. España constituye un extenso mercado farmacéutico, regido por unas normas regulatorias exigentes y plenamente homologables con las de la Unión Europea de la que somos parte —de hecho, en nuestro ámbito europeo España lidera con frecuencia procedimientos de registro con validez en todo el ámbito comunitario—. Incluso, cabe decir sin tapujos que el Ministerio de Sanidad, en cuanto a competencias sanitarias en el conjunto de la nación, está actualmente constituido por poco más que la Agencia del Medicamento. Tenemos una extensa red de Oficinas de Farmacia, que constituyen una primera línea de sanidad; disponemos de un conjunto de servicios de Farmacia Hospitalaria, con implantación en nuestro Sistema de Salud, que garantiza una prestación farmacéutica a cargo de profesionales formados tras largos períodos de residencia hospitalaria, homologables con los de mayor nivel del mundo en cuanto a extensión e intensidad de su formación; desde la formación y especialización farmacéutica, en fin, hemos sido capaces de incorporar a un buen número de nuestro titulados al ámbito del laboratorio clínico (en sus diversas versiones: Bioquímica, Microbiología, Hematología) contribuyendo así a la actualización de una tarea de tanta enjundia para la asistencia sanitaria.

Todo este esquema organizativo de una Farmacia española, plenamente integrada en un Sistema de Salud digno de un país moderno, no es algo que haya surgido por generación espontánea, ni tampoco ha tenido un desarrollo fácil, ni obvio. Por el contrario, es fruto de la visión de futuro y del compromiso de quienes han sabido encontrar los caminos y, con frecuencia, incluso vencer resistencias internas, superar el inmovilismo que también en nuestro seno a veces se ha manifestado en forma del más vacío y acrítico triunfalismo. «Me duele la Farmacia», había llegado a afirmar, parafraseando a Unamuno, un Juan Manuel Reol estudiante de Farmacia, ante un claustro de profesores y muchos de sus compañeros. Así lo recordaba él mismo, en una reciente entrevista biográfica publicada en *Diario Médico*. Sin duda esa inquietud le llevaría a ser el principal artífice de una serie de iniciativas institucionales en su etapa profesional en la Administración.

Toda trayectoria humana está sembrada de instantes en que la bifurcación de caminos obliga a elegir, a optar por una entre varias oportunidades; también hay momentos en que el elenco de posibili-

dades por las que optar se estrecha, pero, incluso entonces, el coraje y la imaginación distinguen a quienes, pegándose al terreno de lo posible, saben convertir en oportunidad lo que pueda parecer un acontecimiento negativo. Como es sabido, el Doctor Reol hubo de abandonar una prometedora e incipiente carrera académica —debido a especiales circunstancias familiares— para integrarse de lleno en la actividad profesional fuera de la Universidad. Llevó a ese ámbito su inquietud básica: la Farmacia o es científica o no es.

Pronto escalaría Reol al máximo rango de la administración farmacéutica: la Subdirección General de Farmacia, dentro de la Dirección General de Sanidad, puesto que habría de desempeñar entre 1971 y 1977. Asombra la cantidad y el calado de las normas de política sanitaria farmacéutica producidas durante ese período, y asombra más si se tiene en cuenta que esa etapa incluye una buena parte de la transición política española. No es de extrañar que todo ello culminara en la elevación, de la citada Subdirección General, al rango de Dirección General de Farmacia. Un puesto hecho a la medida de Reol, que había sido el gran diseñador de una Farmacia institucional propia de los tiempos en nuestro país. El desempeño de esa Dirección General ya estaría a cargo de Reol durante poco más de un año (1977-78); otras tareas nuevas y apasionantes le esperaban también en la gestión pública a las que no dudó en acceder. Imagino que le habría de costar dejar el ámbito de su gran obra —la institucionalización de la política farmacéutica—, pero también supongo que la propuesta poética de León Felipe *...pasar por todo una vez/ una vez sólo y ligero...* le evocaría una forma de actuar, una actitud vital de quienes, siguiendo también al poeta quieren sobre todo que *...no hagan callo las cosas/ni en el alma, ni en el cuerpo...*

A pesar de la brevedad de esta intervención, es obligado mencionar las disposiciones básicas debidas a la acción del Doctor Reol, además de señalar que para legislar y decretar en estos ámbitos no basta con ocupar un puesto en el organigrama del Ejecutivo. Exige la determinación de quienes tienen las ideas claras, así como la capacidad para persuadir, algo que solo logran quienes a su vez están persuadidos de sus propias razones:

- La normativa sobre Farmacovigilancia de 1973, que implanta la tarjeta de notificación de reacciones adversas.

- Las normas sobre registros de medicamentos, también de 1973, que adelantaban en trece años lo que habría de ser nuestra adhesión a la CE.
- La normativa sobre ensayos clínicos de 1978, que incorporaban a España en este tema a los principios bioéticos irrenunciables formulados por la declaración de Helsinki y su continuación en Tokio: la primacía del ser humano, incluso frente a los intereses de la Ciencia y la Medicina.
- La ordenación de la Farmacia Hospitalaria mediante orden ministerial de 1977, considerada como la Carta Magna de la Farmacia Hospitalaria Española.
- La transformación del sistema de autorización y apertura de Oficinas de Farmacia en España, que crea un sistema de establecimientos sanitarios en el que se articula la responsabilidad pública con la titularidad privada del servicio.
- La promoción y potenciación del Cuerpo de Farmacéuticos Titulares, la creación del Cuerpo Farmacéutico de Sanidad Nacional y las primeras iniciativas para la puesta en marcha del sistema Farmacéuticos Residentes (FIR).

Se trata de una ingente aportación institucional que sitúa los asuntos farmacéuticos en un lugar privilegiado de la Administración pública sanitaria y abre el camino para otras disposiciones básicas que habrían de seguir. Entre éstas están, el Real Decreto Ley de Especializaciones Farmacéuticas de 1982, aprobado a finales del mandato del Profesor Federico Mayor como Ministro de Educación y Ciencia. Tuve el honor y el privilegio de presidir durante 8 años el Consejo de Especializaciones derivado de ese decreto, que orientó un desarrollo profesional farmacéutico de bastantes miles de especialistas hospitalarios, cuya actividad profesional resulta básica para los cuidados de salud en nuestro país. Seguirían también la Ley del Medicamento, con diversas versiones, que consagran un marco de uso racional, garantías de eficacia, calidad y seguridad de medicamentos y productos sanitarios. No es casual el que, a día de hoy, quien pretenda encontrar las claves de la Sanidad institucional, en el correspondiente Ministerio del Gobierno de la Nación, se pueda encontrar con una palabra clave: Farmacia y Medicamento como el ámbito más definitorio de la tarea de este departamento ministerial.

El Doctor Reol nos dejó un relato imprescindible de sus ideas y experiencias profesionales en su discurso de ingreso en esta Real Corporación titulado «El medicamento hoy: de la investigación a los aspectos socioeconómicos», contestado también magistralmente por otro muy recordado académico, Profesor Rafael Cadórniga. Llegó Reol a esta casa con el ánimo bien dispuesto y la convicción de haber alcanzado una distinción de la que había que hacerse acreedor, día a día. Su discurso es un retrato de su persona y de su trayectoria, una reflexión sobre lo que ha significado el desarrollo de la Farmacia, en función de bases científicas racionales, así como una valoración de lo que supone para la calidad de vida de las personas. El medicamento es una herramienta social que sólo en manos de profesionales y políticos humanistas puede cumplir su función en la sociedad actual.

Permítaseme, finalmente, una breve valoración, desde una vertiente más personal, de la figura del Doctor Juan Manuel Reol. Interesado, desde mis tiempos de estudiante, por una mejora de nuestras facultades universitarias, como paso esencial para el avance profesional y las reformas que hacían falta, tuve noticia temprana de un nombre, el de Reol, que se revelaba ya como una figura emergente en la Farmacia institucional. No obstante, mi primer encuentro personal con Juan Manuel Reol no llegó hasta 1976, con mi regreso a Madrid como Profesor Agregado Interino de la Facultad en la que he servido desde entonces. En su despacho de la Subdirección General de Farmacia pude conocer los esfuerzos para configurar adecuadamente el Centro Nacional de Farmacobiología, como herramienta fundamental para la tarea regulatoria de la Sanidad Institucional. Pronto pude saber de sus actividades —siempre incansable en la tarea— de reforma de la administración para actualizar todo lo relacionado con la Farmacia y el Medicamento en España. A este primer encuentro habrían de seguirle innumerables ocasiones de conversar y compartir inquietudes, anhelos e iniciativas diversas. Recuerdo su presencia frecuente en comisiones y grupos de estudio sobre la formación de farmacéuticos, aportando esa visión desde un mundo real que tanto necesitamos en la Universidad para bien de nuestros estudiantes, futuros profesionales. Especialmente grato para mí es recordar las ocasiones en que pude conversar largamente con el Doctor Reol sobre temas siempre actuales: la Ciencia, la Farmacia, el Medicamento, España y su futuro,

como lo es el recordar las reuniones del Consejo Asesor de la Agencia del Medicamento, del que formamos parte en sus inicios, como igualmente recuerdo, con agradecimiento, el que me animara a ser presentado como candidato a la medalla que desempeño en esta Real Academia. Son recuerdos que refuerzan los afectos que uno siente por quienes han dejado una huella permanente en la profesión y en la Academia.

Juan Manuel Reol Tejada pertenece a una generación de españoles que se prepararon como universitarios en la década de los cincuenta, superando limitaciones a base de esfuerzos, y pusieron las bases para un lanzamiento de la nación española hacia el futuro. Una España, que en los sesenta y parte de los setenta, en plena modificación de estructuras y mentalidades, consolidaba su decisión de cambiar, con distintos grados de intensidad —evolución, reforma, ruptura, revolución— según las preferencias de cada cual, hacia un modelo de vida y de organización social propia de las democracias occidentales, de un Occidente europeo al que teníamos acceso y por el que nos movíamos ya con facilidad una parte de la juventud de entonces. La Sanidad fue uno de los pilares de esa transformación; desde su experiencia como sanitario, Reol también se integró en un grupo selecto de personas que plantearon con audacia y honradez los cambios políticos. Pero, eso ya no forma parte de mi cometido de esta tarde. Yo he venido a describir cómo el nombre del Doctor Reol describe una etapa de la Farmacia española.

He dicho.

Juan Manuel Reol en la cercanía

N. Víctor Jiménez Torres

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excma. Señora Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia,

Excmos. Señores Académicos,

Familiares del Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada,

Compañeros y amigos.

La llamada telefónica del Excmo. Señor Don Guillermo Giménez Gallego, para comunicarme el acuerdo de la Sección Sexta, respecto a mi participación como ponente en esta Sesión Necrológica en Memoria de nuestro querido amigo y compañero el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, me llenó de responsabilidad en más de una dimensión; de éstas destacaré dos. En primer lugar, porque el acto era promovido por la Real Academia Nacional de Farmacia, «nuestra casa»; en segundo lugar, porque glosar a Juan Manuel desde un posicionamiento familiar, tenía muchas probabilidades de alcanzar un resultado con sesgos sólo explicables por los lazos que nos unían.

Mis palabras, enmarcadas en el título «Juan Manuel Reol en la cercanía», desean superar el relato para reflejar la reflexión alcanzada tras recordar las conversaciones personales mantenidas y las recientemente realizadas con algunos de sus familiares y amigos más cercanos, para ser fiel en la descripción de los rasgos que he recogido. La lectura de varios de sus escritos, libros y algunas cartas personales, junto a los momentos vividos en la cercanía de acontecimientos familiares, ha constituido igualmente el núcleo de esta disertación. Desconozco cuán acertadas les parecerán mis palabras, pero tengan la convicción que han sido escritas desde situaciones personales focalizadas en los recuerdos y emociones que he tenido la suerte de compartir con el homenajead.

Hoy es un día en el que pesan los recuerdos; también es un día para espantar a los que generan tristeza y sobrevivirlos, ya que olvidarlos es más difícil. Por ello, mi participación en este acto desea alcanzar un tono de agradecimiento a la vida y de esperanza; para ensalzar ambos valores he seleccionado una de las estrofas de la poesía *Gracias a la vida*, escrita por la poetisa y cantante chilena Violeta Parra, hace más de cincuenta años:

*«Gracias a la vida, que me ha dado tanto,
Me ha dado la marcha de mis pies cansados,
Con ellos anduve ciudades y charcos,
Playa y desiertos, montañas y llanos,
Y la casa tuya, tu calle y tu patio».*

Gracias a la vida, que me ha dado tanto.
(Fragmento de la poesía *Gracias a la Vida*. Violeta Parra. Chile, 1917-1967).

Juan Manuel era un hombre de moralidad absoluta, con una ética profunda en todos sus actos y un sentido religioso en sus relaciones. Era una persona con alta responsabilidad y lealtad a todo y a todos.

Era (Juan Manuel) un purista en muchísimas dimensiones de la vida, y esta condición tan personal la trasladaba al trabajo. En sus planteamientos siempre manifestó ilusión y espíritu constructivo que conjugaba de manera maestra, ya que en no pocas ocasiones transformó dificultades en facilidades y esto le permitía alcanzar el consenso con una maestría digna de recordar.

La política la entendió pero no sin esfuerzo; no dejaba nada a la improvisación porque era muy exigente consigo mismo y muy estricto para no aproximarse al principio de entropía máxima. Al ser un pensador con criterios liberales, no era un dogmático, aunque sí impregnaba de profundidad cristiana su vida de manera que su impronta personal no pasaba desapercibida, pero no imponía sus convicciones.

Juan Manuel era un hombre generoso y era público su profundo respeto por el mundo de las Academias allá dónde estuvieren, por la Universidad y por las Instituciones políticas. Es una realidad indiscutible su riqueza en amigos en cualquiera de los ámbitos donde

desarrolló su actividad y, a esta sazón, recuerdo la frase «*Era tan pobre que no tenía más que dinero*», con la que el cantautor y poeta Joaquín Sabina inicia su canción «*Pobre Cristina*» (1990).

A Juan Manuel le gustaban las tertulias y era organizador de las mismas porque era un extraordinario comunicador. En su juventud estrenó una comedia, con su pandilla de amigos, siendo el autor del guión; eso sí, aplicando el apotegma del Tao: «el que sabe no habla; el que habla no sabe». Era un hombre que entendió la vida como una apertura hacia el otro y, en palabras de nuestro compañero José Félix Olalla, esto era así porque había hecho de la amistad y del verbo una terapia.

Juan Manuel, en familia, no era tan serio como aparentaba; tenía chispa y encanto; era reconocido como el referente de la misma por su alta responsabilidad que tuvo que demostrar garantizando el sustento de su familia tras la muerte de su padre.

Juan Manuel en su libro «*Palabras de Todo y Nada*», escribió: «*confieso que he vivido como Neruda*». Y añadía: «*la vida ha sido generosa conmigo, tengo cinco hijos y una mujer sensible y fuerte*». Pues, mi querido Juan Manuel, ahora ya son cinco los nietos que te han dado tus hijos.

Manifestaba una gran devoción por su mujer y era altísimo el grado de complicidad que mantenían; todas las decisiones familiares siempre fueron por consenso. Es este un buen momento para destacar que María Ángeles, además de las cualidades citadas, manifestó un extraordinario entusiasmo por la actividad de su marido al que siempre acompañó en sus múltiples desplazamientos por Castilla y León, por España y por el mundo.

Juan Manuel inculcó a sus hijos valores como la tolerancia y la fortaleza y una educación basada en el trabajo bien hecho, el sentido del deber y la honradez; a todos les dio un mismo consejo: hay que buscar la felicidad en la vida y ser el mejor en lo que hagas, sin importar la actividad que desarrolles. Era un hombre de mucho ánimo y ni el sufrimiento que le ocasionaba su enfermedad le impedía mantener su alegría con los diferentes miembros de la familia, especialmente con sus nietas, que a pesar de las diferencias de edad entre las mismas a cada una le aportaba lo que presentía que nece-

sitaba, desde un consejo a un juego. Le preocupaban mucho más los males de los demás miembros de la familia que los propios.

Juan Manuel entendió la amistad mejor que la política; era un hombre leal y muy pudoroso para sus cosas y para las cosas de los demás. Siempre reconoció no guardar rencor a nadie y a este respecto escribió: *«no tengo más enemigos que los que ellos quieran serlo míos»*.

Era (Juan Manuel) generoso con los amigos y con los compañeros; siempre encontraba un momento para el recuerdo y la palabra certera para el elogio, sin distinción entre ambos. Mi devoción personal por la obra del jesuita Baltasar Gracián, me ha llevado a reconocer en los escritos de Juan Manuel la máxima de Gracián: *«tanto valdrá uno cuanto quisieren los demás; y para que quieran se les ha de ganar la boca por el corazón»*.

Juan Manuel era un buen conocedor de que la vida es cambiante, crítica y caprichosa; estas características, aparentemente contrapuestas a su impronta castellana, nunca fueron incompatibles con su capacidad para reconocer en todos sus amigos la más alta consideración y valía; y es que Juan Manuel era muy agradecido con todos. También exigía reciprocidad porque estaba muy orgulloso de su obra y de sus logros en la Administración, en la Academia y en la Política.

Juan Manuel ha vivido sus sueños y como todos los que lo logran son personas únicas; pero la vida es inabarcable y como dice Gala: *«la vida en sí misma es inseguridad»*. A pesar de todo esto, con su enfermedad y lo que representaba, fue exquisito y cuidadoso, durante los largos años que le acompañó, por respeto a los demás; no quería que nadie sufriera los inevitables costes de la misma, más apreciables en su cuerpo que en su alma. Esa visión cristiana explicaría los testimonios de amigos que me han reconocido la encomienda diaria de su alma a Dios. Creo firmemente que en este momento todos participamos del mensaje que el profesor Randy Pausch, al reflexionar sobre su anunciada y prematura muerte, expresa en su libro «La última lección»: *«al morir una parte de nosotros se ha ido con él»*.

En una de mis últimas conversaciones con Juan Manuel y con motivo de una distinción de la SEFH que lleva su nombre, me dijo que le gustaban los homenajes en los que podía participar. Por ello

concluyo mi intervención haciendo propias las palabras del último párrafo que escribió para su discurso como primer Académico de Honor de la Academia de Galicia y que no llegó a pronunciar en público:

«José Ángel Valente, vuestro paisano y grandísimo poeta, dice: “Las palabras vuelven como vuelve el mar”. Yo quiero volver a Galicia y comprometerme con esta Academia, con la misma firmeza y la misma esperanza con la que siempre, siempre, retorna el mar».

Muchas gracias.

He dicho.

Homenaje a Don Juan Manuel Reol Tejada

Antonio L. Doadrio Villarejo

Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excma. Señora Presidenta de la RANF; Excmo. Señor Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Don Alberto Galindo Tixaire; Excmo. Señor Presidente de la Academia de Jurisprudencia y Legislación, Don Landelino Lavilla Alsina; Excmo. Señor Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, Don Miquel Ylla-Català; Señora Directora General de Farmacia y Productos Sanitarios, Doña María Teresa Pagés; Señor Presidente del Tribunal de Cuentas, Don Manuel Núñez Pérez. Excmas/os. Señoras/Señores Académicos; Ilustrísimas personalidades, Señoras y Señores.

Es para mí un honor asumir la encomienda de glosar la vida académica de una personalidad de la talla de Don Juan Manuel Reol Tejada, a la par que una gran responsabilidad, ya que con toda seguridad esta Corporación puede encontrar académicos de mayor relieve para construir una *laudatio* más acorde al personaje que hoy homenajeamos, para convertirla en un epinicio que, tal como hacía Pindaro en la Grecia clásica, armónicamente nos desglosara la historia del héroe.

Acepto humildemente el encargo de esta Academia, con todo el respeto y admiración que me engendra la figura de un maestro, para intentar describir su ciclo en esta Academia.

Debo utilizar para ello mis ingenios, por lo que no puedo escribir bellas odas o poemas griegos, pero sí que puedo empezar con una copla española:

*Don Juan Manuel Reol Tejada
Que en la vida dejó fama,
De caballero cumplido,
De hombre sin tacha,
De trabajador constante,*

*De cortés con los demás,
De dignidad sin igual,
De cristiano humilde
Y de padre y marido ejemplar.*

Comienza su andar en esta Academia el 14 de noviembre de 1991, tomando posesión de su plaza de Académico de Número, en la medalla número 23, sucediendo al Profesor Román Casares, con la lectura de su discurso: «El medicamento hoy: de la investigación a los aspectos socioeconómicos», faraónico memorándum de 182 páginas —históricamente el mayor nunca escrito por un académico— en el que comienza expresándonos lo que significaba en esos momentos su punto de partida y compromiso con esta Academia: «Para una tan enraizada vocación como la mía, la Academia era un sueño entrevisto», y más adelante añade: «la Academia no es una meta de llegada sino un punto de partida. Con esto quiero expresar mi voluntad de contribuir, en la medida de mis fuerzas, a impulsar los trabajos y, por ende, el prestigio de la Academia hasta lo más alto. Abrirla a la profesión en sus diferentes actividades y, especialmente, como no puede ser de otro modo, a las que desarrollan nuestros compañeros y todos aquellos que, desde una u otra posición, realizan trabajos en la industria farmacéutica».

Una década después, y siendo ya el Doctor Reol Director de esta Academia, nuestro recordado compañero el Profesor Domingo Espinós, decía en una Junta General: «El mérito que tienes, Juan Manuel, es el de habernos puesto a trabajar a todos»; por lo que desde entonces podemos entender que sus palabras de impulsar los trabajos, era toda una referencia a los académicos. En ese discurso, contestado por el Profesor Cadórniga, hace un dibujo magistral de lo que es la atención sanitaria y el consumo de medicamentos en una sociedad abierta, postindustrial y competitiva, en donde se manifiesta su preocupación por la salud, especialmente en los países de pocos recursos económicos.

Su promesa de contribuir en el desarrollo de la Academia se cumple de inmediato, ya que apenas un año después, en diciembre de 1992, es elegido vicesecretario, cargo que ocupa hasta 1995. Posteriormente, en marzo de 1998 es votado vicedirector, etapa que desarrolla hasta febrero de 2000, para ser elegido el 20 de diciembre de ese año

Director de la Academia, cargo traspasado a Presidente por los Estatutos de 2002 y que ejerce hasta el 19 de enero de 2007, por cese reglamentario. Se convierte así en el primer Presidente de la recién denominada Real Academia Nacional de Farmacia, siendo junto al Doctor Zúñiga, los dos únicos Presidentes de esta Academia hasta esa fecha, desde que en 1932 se constituye la Academia Nacional de Farmacia a partir del Real Colegio de Farmacéuticos.

La época en la que dirige y después preside a esta Corporación, es sin duda, una de las más brillantes, si no la más, de nuestro largo recorrido temporal, especialmente en su trascendencia social.

Soy afortunado por haber compartido con él su trabajo y obligado en espíritu por sus enseñanzas, desde los cargos de Bibliotecario y Secretario de esta Academia. Desde esa breve, pero intensa relación académica, surgió una gran amistad. «Amistades que son ciertas nadie las puede turbar», decía Miguel de Cervantes.

Presidió con éxito los destinos de nuestra Institución, mandando sin decretar y por ello sin molestar y es que: «El éxito debe medirse no por la posición a que una persona ha llegado, sino por su esfuerzo en triunfar» (Booker T. Washington).

Durante su mandato se va a ejecutar la más ambiciosa remodelación interior de nuestra Sede; se potenciarán enormemente las sesiones científicas y las publicaciones, bien en forma de monografías o con la creación de la colección denominada «Lecturas Singulares», sin olvidar la gran obra del Diccionario Terminológico de las ciencias farmacéuticas. Se desarrollarán homenajes a científicos farmacéuticos, recuperando su memoria histórica; se dará un nuevo contenido a la Fundación José Casares Gil. Nacerán unos nuevos Estatutos; se creará la Comisión de Informática y Comunicación, que promoverá de manera definitiva la entrada de esta Academia en la sociedad de la información. Impulsará la creación de la Asociación Iberoamericana de Academias de Farmacia, con la celebración del II Encuentro y la firma de la «Declaración de Madrid», y se amplía el horario de apertura de nuestra Sede, estableciéndose turnos de mañana y tarde para dar un mejor servicio a la sociedad, lo que fue su gran preocupación.

Don Juan Manuel Reol escribía en *La Real Academia Nacional de Farmacia: misión y objetivos. Una reflexión general sobre las Acade-*

mias: «Quiero expresar pues, una primera idea. No comparto ningún pesimismo sobre el presente y el futuro de las Academias. Creo que las Academias viven un momento especialmente intenso, como España, y que su presencia y opinión en los acontecimientos más destacados del país pone de manifiesto que las Academias tienen y desarrollan, cada vez más, una importantísima misión social». En ese mismo artículo podemos estimar su idea de las Reales Academias: «Las Academias son un reducto de libertad y una singular plataforma para la búsqueda de la verdad. Lo son porque son independientes del poder y porque su sistema electivo les pone al abrigo de ciertas querencias».

La primera Junta General que preside es la del 20 de diciembre de 2000, a continuación de su elección, en la que toma posesión de su cargo e informa sobre las actividades realizadas por la Fundación Casares durante el ejercicio del año 2000.

El 18 de abril de 2001 lleva a Junta General extraordinaria el anteproyecto de estatutos, aprobado en Junta de Gobierno del 20 de marzo. Dos días después, el 20 de abril, la Junta General todavía reunida en sesión extraordinaria, lo refrenda con las enmiendas aceptadas. En estos nuevos Estatutos, publicados en el *BOE* del 8 de mayo de 2002, por Real Decreto 367/2002, de 19 de abril, se recupera la denominación de «Nacional», que le fue otorgada el 6 de enero de 1932, y que se perdió desde que fue disuelta, como el resto de las Academias el 15 de septiembre de 1936.

El 30 de mayo de 2001 presenta a la Junta General lo que sería su primer proyecto de rehabilitación de nuestro edificio, con la remodelación de la zona noble donde hoy estamos reunidos, y la restauración del salón de espejos para recibir a SS.MM. los Reyes de España en la Solemne Sesión de Apertura del Curso Académico 2002 de las Reales Academias del Instituto de España. Posteriormente, en la Junta General del 5 de junio despliega las obras que se efectuarán en el salón rojo; inaugurándose todas ellas el 16 de octubre de 2002 en la sesión real, y dando cuenta de la recuperación patrimonial del zaguán y vestíbulo de entrada, salones amarillo y rojo y parte de la Biblioteca en la Junta de fin de año celebrada el 19 de diciembre, donde propone la continuación de las obras en biblioteca, el saneamiento del sótano y la colocación de nuevas puertas de entrada. De

la terminación de las últimas da cuenta en la Junta General del 18 de diciembre de 2003 y de la Biblioteca el 23 de junio de 2005.

En esos cerca de tres años que duran las obras en la biblioteca, se producen cambios muy importantes en ella. Se recuperan dos zonas de archivos y un pasillo para la zona noble con un total de 85 m², con nuevos armarios que aumentan la capacidad de almacenamiento y se construyen tres nuevos despachos, a la vez que se mueven a un sótano habilitado con armarios correderos más de 40.000 ejemplares de revistas y se cataloga digitalmente éstas y el resto de nuestros fondos, con un total de 103.617 registros, de libre consulta en nuestra web. También se inicia la rehabilitación completa del aula Santos Ruiz de la planta baja, que se inaugura ya bajo la presidencia de la Doctora Miras Portugal el 22 de noviembre de 2007.

La febril actividad científica que se produce en esta Academia durante su mandato se cifra en más de 250 sesiones científicas, doblando a veces los miércoles y jueves, estableciendo nuevas relaciones con la Real Academia Nacional de Medicina y con la de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, con las que se realizan históricas sesiones conjuntas, la primera de las cuales fue el 31 de marzo de 2004; así como también en la creación de un nuevo formato: las «tertulias científicas de la RANF», que comienzan el 3 de junio de 2004 con el «brote de trichinellosis»; los homenajes a farmacéuticos singulares, como la exposición del legado Moles, con participación de las Reales Academias de Historia, Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Nacional de Medicina y la Española y actos especiales como la exhibición de pintura de artistas farmacéuticos.

En su dimensión más puramente externa, firma un convenio de colaboración el 2 de abril de 2004 con el Instituto de Salud Carlos III; se entrevista, el 21 de marzo de 2005, con el Secretario de Estado de Universidades e Investigación para dar cuenta de nuestras actividades y del esfuerzo que realiza nuestra Corporación, y sobre todo y gracias a sus contactos con la Casa Real, el Pleno de la Academia es recibido en audiencia privada de 40 minutos por S.M. el Rey, el 22 de febrero de 2005, para ofrecerle la Medalla Carracido de Oro en edición especial, la más alta condecoración de nuestra Corporación. Todo ello, sin perjuicio de su diaria preocupación por mantener buenas relaciones con todos los estamentos políticos, sociales y culturales de nuestro

Reino, como lo prueba su participación en las Tertulias de Rebotica del Ateneo de Madrid, sus constantes llamadas al Ministerio para interesarse por la marcha de las dotaciones económicas o su gestión con el Patronato del Museo del Prado, gracias a la cual tenemos en depósito valiosos cuadros del Museo.

Las publicaciones de la Academia se ven también beneficiadas por su enorme capacidad de gestión, con la edición de trece de las veinticinco monografías de la RANF, alcanzando su cénit el 19 de abril de 2005 cuando propone a la Junta General la edición de siete monografías. Asimismo se publican cuatro de los seis números de la colección «Lecturas Singulares», seis libros de homenajes y catálogos; veintitrés monografías de la Fundación Casares Gil (la totalidad de las publicadas hasta la fecha) y sobre todo el Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas, en el que puso especial ilusión y esfuerzo, tal como se desprende de sus palabras del 22 de junio de 2006, dando cuenta en Junta General de la terminación de esa obra: «es equiparable a otras grandes obras de nuestros antepasados académicos, como la Farmacopea Matritensis o el Diccionario de Farmacia de 1860». Además, crea la figura de editor científico de los Anales, al que le asistirá un consejo editorial, aprobado en Junta General del 25 de junio de 2003, lo que supuso un lanzamiento definitivo de nuestra revista, que ha llevado a través de su publicación en formato Open Journal a su indexación en la ISI Web Knowledge.

En 2002 pone en marcha el gabinete informático y la página web, dando cuenta de su intención en la Junta General del 20 de diciembre de 2001, nombrándome Presidente de la Comisión de Informática y Comunicación. Desde ese año, se desarrolló un plan quinquenal que condujo a la creación de una completa red informática interna con tres servidores, impresoras en red y catorce puestos informáticos; de una web que cuenta actualmente con más de seis millones de entradas anuales y 13.318 archivos, que permite mostrar nuestras actividades al exterior, la retransmisión en directo de nuestras sesiones públicas y el más moderno y completo servicio de audición y vídeo en nuestras salas que la tecnología actual puede ofrecer.

Del 4 al 7 de junio de 2007 y bajo su presidencia de honor, se celebra el II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia (AIAF), que concluye con la «Declaración de Madrid», donde las Aca-

demias de Farmacia de Argentina, Brasil, Cataluña, Chile, Galicia, Iberoamericana, México, Murcia, Paraguay, Peruana y la nuestra, promueven el intercambio de experiencias entre las Academias asociadas, el cultivo de las ciencias farmacéuticas y el asesorar a los Gobiernos y organizaciones políticas iberoamericanas, en el mejor servicio a la salud pública y a la sociedad. Una reunión y una declaración que preparó con especial esmero desde su presidencia. Sé del enorme esfuerzo que realizó para llevar a buen término esa reunión y su gran interés para que se creara la AIAF. En una de mis últimas conversaciones telefónicas con él, en el verano de 2008, me recordaba la «Declaración de Madrid» y me encomendaba que lo plasmara para su perpetuación. Aunque me hubiese gustado hacerlo en otro foro, así y aquí lo hago, manifestando solemnemente como Secretario y por tanto notario de esta RANF, que fue su gran y afinado motor.

Si la Academia fue para él como una madre y ya dice un proverbio árabe que «quien quiere a su madre no puede ser malo», la Fundación Casares Gil fue su hija mimada y consentida. «De buena vid planta la viña y de buena madre, la hija». Durante su presidencia la Fundación vio aumentado en un 60 por 100 su presupuesto, gracias a su gestión personal con la Fundación Caja Madrid y con los laboratorios farmacéuticos; se realizaron sesiones patrocinadas por aquella un jueves de cada mes y como no puede ser de otra forma, se pone al mejor servicio de su madre, es decir, de la Academia.

Juan Manuel Reol disponía en su ánimo de una especial delicadeza, comenzando las Juntas de Gobierno y las Generales con un recuerdo a los Académicos enfermos y a sus familiares, así como a las víctimas de accidentes o del terrorismo.

Con las Juntas de Gobierno era riguroso, fijaba siempre a principios de año el calendario y decía que lo más importante que tenía un miembro de esa Junta era su asistencia mensual a ellas.

Buscaba siempre la armonía y colaboración de todos los miembros de la Junta de Gobierno, lo que era también proyectado a los demás. He extraído un párrafo de una Junta de Gobierno en este sentido, omitiendo los nombres: «Tras un intercambio de opiniones entre los Doctores..., el Doctor Reol aúna las opiniones de todos en el sentido de que en la Corporación prima el principio de colaboración de todos los Académicos».

Desde la Junta de Gobierno impulsa la actividad de las secciones, entendiendo que desde ellas es de donde surge la actividad académica y que es el foro idóneo de debate para proponer a Académicos Correspondientes.

Planificaba con cuidado y exhaustivamente las actividades de la Academia, mostrando el resultado de su trabajo en rigurosos informes que presentaba a la Junta de Gobierno y a la General.

El 21 de diciembre de 2006 preside su última Junta General y el 11 de enero de 2007 la de Gobierno; traspasando la presidencia de la Academia a la Doctora Miras el 19 de enero de 2007 en la sesión de inauguración del curso académico.

El 4 de junio de 2007 y por unanimidad es elegido Presidente de Honor en Junta General Extraordinaria, cargo que desempeñó hasta su fallecimiento. Este sería un cargo especial para él, manifestándome en diversas conversaciones que no podíamos imaginar el honor que le hacíamos con ese nombramiento.

Aunque muy condensado por necesidad de ajustarme al tiempo que me han concedido, espero haber conseguido mi propósito de dar una visión de una época que ya está enmarcada en nuestra historia, en la que el Doctor Reol fue su protagonista y un líder que hizo buena la definición de Luigi Giurfa: «Líder no es mandar, es saber servir y dirigir a los demás con propósito y amor».

Aunque sin duda, la frase más adecuada para esta etapa de Juan Manuel Reol es la locución latina de Julio César al dirigirse al Senado romano en 47 a.C., describiendo su victoria en la batalla de Zela: «Vini, vidi, vici».

Y para terminar este homenaje he escogido un poema de Antonio Machado:

*Era un niño que soñaba
un caballo de cartón.
Abrió los ojos el niño
y el caballito no vio.*

*Con un caballito blanco
el niño volvió a soñar;
y por la crin lo cogía...
¡Ahora no te escaparás!*

*Apenas lo hubo cogido,
el niño se despertó.
Tenía el puño cerrado.
¡El caballito voló!*

*Quedose el niño muy serio
pensando que no es verdad
un caballito soñado.
Y ya no volvió a soñar.*

*Pero el niño se hizo mozo
y el mozo tuvo un amor,
y a su amada le decía:
¿Tú eres de verdad o no?*

*Cuando el mozo se hizo viejo
pensaba: Todo es soñar,
y el caballito soñado
y el caballo de verdad.*

*Y cuando le vino la muerte,
el viejo a su corazón
preguntaba: ¿Tú eres sueño?
¡Quién sabe si despertó!*

Adiós amigo, nosotros sí despertaremos y nos volveremos a ver, porque la vida eterna es un don que no se puede perder. «El que come mi carne y bebe mi sangre, tiene vida eterna, y yo le resucitaré el último día» (Juan, 6:54).

He dicho.

Don Juan Manuel Reol: Un líder para una época

María Teresa Miras Portugal

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Los Excelentísimos Señores Académicos que me han precedido en el uso de la palabra han recordado de modo magistral las distintas etapas y facetas de la trayectoria vital de Don Juan Manuel Reol Tejada, quien fue nuestro Presidente durante dos mandatos, el máximo que permiten nuestros estatutos, siendo posteriormente elegido Presidente de Honor de nuestra Academia. Como Institución nos sentimos orgullosos de su obra. Como amigos y compañeros sentimos profundamente su pérdida.

La figura de Don Juan Manuel no ofrece fisuras, honesto hasta la médula, servidor de las más altas instituciones del Estado, no dejó nunca que sus intereses personales interfirieran con lo que consideraba su deber.

Fue un ejemplo viviente de buen hacer y sacando fuerza de su propia flaqueza fue capaz hasta el último momento de imponerse a los avatares de una dolorosa enfermedad, haciendo suyo el contenido del gran poema de Ruyard Kipling «If/Si»:

*Si logras que tus nervios y el corazón te asistan,
Aun después de su fuga de tu cuerpo en fatiga,
Y se agarren contigo cuando no quede nada
Porque tú lo deseas y lo quieres y mandas.*

Sí, ciertamente que Don Juan Manuel, al imponerse a toda su fragilidad, fue un ser humano en la plena dimensión de la palabra, un frágil ser humano en toda su grandeza.

Toda institución necesita una cabeza lúcida y noblemente ambiciosa que posea al mismo tiempo la capacidad de imaginar y soñar cuáles son los nuevos retos y con el carisma de aunar en torno a su

persona gente capaz y convencida de que la empresa vale la pena. Sólo así se prospera y sólo así es posible adaptarse a una sociedad siempre dinámica y cambiante.

Como institución, esta Real Academia Nacional de Farmacia tuvo la suerte de tenerlo al frente de la nave en los años recientes que exigían un cambio de rumbo.

Años en los que fue preciso reflexionar sobre nuestro propio destino como institución.

Años en los que fue necesario plantearse cuáles eran los medios a nuestro alcance para servir a la sociedad.

Años en los que esta Academia se hizo más visible y más accesible y de modo especial a los profesionales de las ciencias farmacéuticas y afines, que con sus preocupaciones y problemas han contribuido a darnos contenido y enriquecer nuestros objetivos.

Años en los que fortaleció la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y consiguió el apoyo de particulares, de las empresas farmacéuticas y de otras instituciones civiles para fomentar la actividad de difusión cultural de la Academia.

Años en los que nuestra Academia tuvo el privilegio de ser dirigida por un capitán con las ideas claras y el brazo firme.

¿Qué virtud le concedía a Don Juan Manuel el don de ser escuchado? ¿Qué secreto mecanismo le otorgaba el don del magnetismo?

Tal vez esa sea la secreta grandeza que poseen las personas con carisma a las que llamamos líderes. Pero líder puede resultar una palabra nostálgica y ambigua del pasado, lo que no ocurre con la realidad concreta de Don Juan Manuel.

No podemos obviar que su carácter era el de un castellano de Burgos, fraguado en la recia tierra que versó Unamuno:

*Tú me levantas, tierra de Castilla,
en la rugosa palma de tu mano.*

*Tierra nervuda, enjuta, despejada,
madre de corazones y de brazos.*

Quizá fue esa madre tierra la que le dio el coraje y la perseverancia.

Desgranando su actuación en nuestra Academia es de resaltar que Don Juan Manuel conseguía siempre sumar y nunca se daba por vencido en la posibilidad de diálogo y de convencer. Tenía la virtud de hacer comprender a sus interlocutores las ventajas de aunar esfuerzos en cualquier actividad, de la gran riqueza que suponía para cualquier institución el contar con opiniones plurales cuando éstas son fundamentadas y no van dirigidas a entorpecer.

Me he preguntado muchas veces cómo lo conseguía, cómo era capaz de convencer a los demás de iniciar empresas que suponían para cualquiera de nosotros más trabajo y preocupaciones, y en esto hablo por propia experiencia y a sabiendas de que ha habido «muchos cómplices», en el mejor sentido de la palabra cómplice, entre todos los académicos y cargos académicos que durante su mandato iniciaron actividades y trabajos de gran compromiso y esfuerzo para con esta Institución.

Don Juan Manuel mantenía excelentes relaciones con todas las instituciones del Estado y de modo especial con otras Academias de Farmacia, que han organizado sesiones en su honor. Como Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia quiero expresar mi gratitud a todas ellas. Permítanme que haga referencia solamente a dos de estos actos. En primer lugar, el homenaje celebrado el 1 de diciembre de 2008 en la Real Academia de Farmacia de Cataluña, de la cual don Juan Manuel era académico correspondiente. Los Excelentísimos Señores Don Francisco Taxonera y Don Miquel Ylla-Català i Genis, Presidente de la Institución, dejaron constancia de su excepcional labor, resaltando su figura de hombre de estado y su encomiable labor cuando fue preciso actualizar el registro de especialidades farmacéuticas; situación en la que no regateó esfuerzos para apoyar y potenciar la industria farmacéutica que tanta riqueza y empleos de calidad generaba. Su trabajo fue el de un gran hombre de Estado.

El acto en honor de Don Juan Manuel en la Real Academia de Galicia, celebrado el 19 de enero de 2009, resultó de especial emoción. El anterior presidente Excmo. Señor Don Jesús Izco y el Presidente actual Excmo. Señor Don Isaac Arias, hicieron emotivos discursos recordando la figura de Don Juan Manuel, quien había sido nombrado el primer Académico de Honor de la Academia de Farmacia de Gali-

cia en reconocimiento a su esfuerzo y ayuda para elaborar los estatutos y sortear las dificultades iniciales. Su toma de posesión prevista para el 9 de junio de 2007, se tuvo que suspender como consecuencia de su enfermedad y en este acto se me concedió el privilegio de leer el discurso que había dejado preparado don Juan Manuel.

Nuestra Institución se siente especialmente agradecida por el afecto mostrado por su Majestad el Rey Don Juan Carlos en la apertura de curso de las Reales Academias, celebrado en la Real Academia Nacional de Medicina en octubre de 2008. Su Majestad expresó personalmente su pesar por el fallecimiento de quien había sido nuestro Presidente de Honor, y sin lugar a dudas un súbdito leal y un gran señor.

Don Juan Manuel fue siempre eso: un digno y excepcional servidor del Estado, desde todos los cargos que ocupó, derrochando generosidad para con los otros y la máxima exigencia para consigo mismo.

Esa exigencia la llevó a su vida personal, con fama de hombre austero, y poco proclive a mostrar su faceta más frágil. Cuidado con mimo por su esposa, Marilines, cuyos ojos verdes siempre iluminaron la vida de Don Juan Manuel, sufrió con gran estoicismo, recaídas y recuperaciones, sostenido por el amor de su familia y una férrea voluntad basada en sus sólidos principios y creencias.

Su familia, su esposa M.^a Ángeles Jiménez Díez de la Lastra, sus hijos M.^a Ángeles, Teresa, Marta, Juan Manuel y Javier, eran lo más querido ypreciado, y a ellos queremos transmitir todo el respeto, y profundo cariño que esta Real Academia profesaba a Don Juan Manuel Reol y despedirle con las más antiguas palabras castellanas: las de Gonzalo de Berceo:

*Cuando aquí vivimos, en ajeno moramos;
la fiçanza durable suso la esperamos,
la nuestra romería estonz la acabamos
cuando a paraíso las almas enviamos.*

Descanse en paz el hombre de bien, que tanto nos dio, su memoria permanecerá entre nosotros y es y será parte de nuestra Historia.

M.^a Teresa MIRAS PORTUGAL
Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

