

Imagen de portada:

**Actividad en la unión de Lectina por
microscopía de epi-fluorescencia.**

Palabras de la Presidente de la Academia en la inauguración del curso académico 2012 de la RANF



María Teresa Miras Portugal

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Recibido el 20 de febrero de 2012

e-mail: edicion@ranf.com

Esta apertura de curso del año 2012 tiene para mí un significado especial. Se cumplen en este acto 5 años de mandato para el cual Vds. me han elegido como Presidente de esta Real Institución. El próximo año como mandan los estatutos en este acto solemne pasaré el testigo al nuevo presidente que Vds. elijan.

Como prelude, este año hemos renovado los cargos de Secretario y Tesorero por cumplir el máximo reglamentario de sus mandatos, Don Antonio Doadrio Villarejo y Don Bartolomé Ribas Ozonas que tan eficaz y generosamente han servido a nuestra Real Academia. Gracias a Don Antonio Doadrio, quien seguirá al frente de la Pagina Web, que tanta visibilidad ha dado a nuestras actividades y ha puesto en valor el gran acervo de conocimiento científico y humanista que atesoramos. Sin duda, ha servido como vaso comunicante hacia una sociedad que hoy más que nunca debe de afianzarse en el conocimiento para avanzar.

Gracias a Don Bartolomé Ribas que ha sido nuestro tesorero y ha armonizado nuestras cuentas con paciencia y gran caballerosidad. Afronta ahora un nuevo reto, el de la secretaría de la Real Academia, que requiere de gran esfuerzo y generosidad personal en el tiempo de dedicación, pues todos somos conscientes que la actividad en nuestra institución es intensa.

Damos la bienvenida a Don Fidel Ortega Ortiz de Apodaca como nuevo tesorero, se cumple en él el buen hacer de una dinastía de académicos. Su gran experiencia en puestos de gestión académica, como Decano de la Facultad de Farmacia de Alcalá, será sin duda de gran ayuda en esta Institución.

Agradecer también la fecunda y fructífera labor de Don Juan Ramón Lacadena, una vez concluidos los dos mandatos reglamentarios al frente de la Sección segunda.

No es necesario recordar ante Vds. que la labor que hemos de realizar no es solitaria y necesita de una bien coordinada labor de equipo con los miembros de la

Junta de Gobierno y todos y cada uno de los académicos que integran nuestra Institución.

Es de justicia, además del afecto, mencionar a todo el personal de la Academia, que con su buen hacer permite el funcionamiento diario de una institución desbordante de actividad y con vocación expansiva y vitalista, son ellos que cuidan de todos los detalles y hacen que nos encontremos a gusto.

Entre todos, y solamente entre todos, podremos hacer frente a estos años difíciles. Hemos vivido otras travesías singulares, y el temporal casi galerna, que hemos de cruzar, quizás tenga la virtud de ponernos alerta para optimizar con inteligencia y solidaridad nuestros recursos.

Este acto de apertura tiene un cierto componente de nostalgia pues sentimos la ausencia de nuestros compañeros académicos: Don José Luis Vila Jato, maestro indiscutible, renovador e impulsor de la tecnología y nanotecnología farmacéutica y Don Guillermo Tena, eminente toxicólogo, quien en un acto de generosidad y grandeza, cuando le alcanzó la edad, renunció a su plaza de Académico de Número, pasando a supernumerario, para según sus palabras dar paso a los jóvenes que pudieran realizar una labor fecunda y que hicieran avanzar nuestra Academia.

Recordémosles con las palabras de Don Francisco de Quevedo:

*¡Cómo de entre mis manos te resbalas!
¡Oh, cómo te deslizas, edad mía!
Alma a quien todo un Dios prisión ha sido,
Venas que humor a tanto fuego han dado,
Médulas que han gloriosamente ardido.*

Ellos vivirán en nuestra memoria y forman parte de nuestra noble, trabajada y fecunda historia.

Hoy tenemos el privilegio de disfrutar de la compañía de Don Raúl Guerra Garrido, a quien se ha distinguido con el más alto honor de nuestra Academia: La Medalla Carracido de Oro. Pertenece Don Raúl a esa estirpe de Farmacéuticos humanistas, grandes escritores, de los que nos sentimos legítimamente orgullosos, no olvidemos que Dante Alighieri y León Felipe, también boticarios le han precedido.

Todos los miembros de esta Academia y los aquí presentes soñamos con encontrar ese cuaderno secreto donde un antepasado boticario nos transporte a un mundo casi extinto pero cuyas señas de identidad nos resultan tan entrañables, tan humanas, cargadas de enseñanza cotidiana y de humor, como la vida misma. Y

si Voltaire en su célebre frase decía que: *“Los doctores son hombres que prescriben medicinas que conocen poco, curan enfermedades que conocen menos, en seres de humanos de los que no saben nada”*, Don Raúl recupera del cuaderno de su abuelo una frase más rotunda y más propia de nuestra vieja raza celtibera: *“Mas mata la receta que la escopeta”*.

Para tranquilizar a los que accedan a estas palabras, decirles que vamos mejorando en todos los aspectos: Conocemos como actúan medicamentos que son muy eficaces y sabemos para qué enfermedades están indicados. Lo que si se nos escapa es la inmensa complejidad del ser humano y su capacidad creativa. Esperemos que los incorregibles humanos siempre nos sorprendan y nos sorprendamos.

Como en años anteriores muchos han sido los eventos científicos que han tenido lugar en nuestra Academia a lo largo del año 2011 y el Sr. Secretario dará lectura en su memoria. Permítanme solamente destacar mi agradecimiento a todos aquellos que han conseguido con su participación, organización e intervenciones, que nuestra Academia se haya convertido en lugar de referencia en nuestro país, donde la ciencia más actual en el área de la vida y la salud, permita el encuentro amable y estimulante de aquellos que sienten curiosidad y se preocupan por el avance del conocimiento.

Finalizo deseándoles que este año 2012 que acaba de empezar sea feliz y prospero en lo personal y que nuestra Academia siga siendo un foro de debate de las ciencias farmacéuticas y afines y de las interfaces ciencia/humanidades. Gracias a todos por su presencia en ese acto y en Nombre de su Majestad el Rey Don Juan Carlos I declaro inaugurado el curso 2012 en la Real Academia Nacional de Farmacia.



Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

“Yo quería un retazo de oscuridad aunque fuera sin estrella”. Así comienza un párrafo del libro *“La América que amo”*, recientemente publicado por nuestro laureado escritor farmacéutico Raúl Guerra Garrido, galardonado en enero pasado con la Medalla “Carracido” de oro, máxima distinción que concede la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España.

Pocas semanas antes, quien suscribe pronunció una conferencia en la Universidad de Salamanca, en un acto conjunto de la Facultad de Farmacia y la Academia de Castilla y León, que versó sobre *“Los farmacéuticos en las expediciones científicas a América en el siglo XVIII”*.

La citada alocución fue acompañada de una película realizada por el profesor farmacéutico peruano Enrique N. León Soria, que me acompañó por los bosquetes de quina existentes entre San Ignacio, Jaén y la frontera ecuatoriana. Debe recordarse que el escudo de la bandera del Perú, entre otros símbolos tiene el árbol de la quina. Pretendemos, con la ayuda de la AECID, plantar arbolitos en las plazas de armas de los pueblos y ciudades, para que niños y soldados, al jurar bandera estén orgullosos de lo que su quina significa.

En las recientes elecciones del Ateneo de Madrid, quien redacta estas líneas fue elegido Presidente de la Sección Iberoamericana; entre otros miembros que forman parte de esta sección, deseo destacar a la también catedrática de la Facultad de Farmacia de la UCM, Profa. Dra. Esperanza Torija, activa colaboradora de la RANF y que ha dictado durante muchos años cursos de Bromatología en numerosas universidades iberoamericanas, destacando principalmente en Paraguay.

La actividad de esta sección ha sido intensa, organizándose varias conferencias y promoviéndose la creación de una cátedra de Iberoamérica.

Recientemente en la UN de Colombia han comenzado a impartirse enseñanzas de Diplomado en *“Biotecnología Farmacéutica”*, su director indica que hay que conocer el incremento de fármacos de origen biotecnológico que

demandan un conocimiento profundo de los aspectos básicos en biología molecular necesarios para su comprensión y análisis. El programa académico cuenta con ocho módulos, con especial énfasis en los productos terapéuticos recombinantes y propiedad intelectual. El vencimiento de las primeras patentes de estos productos, y el interés de la industria farmacéutica requiere un conocimiento actualizado y profundo de estos temas.

Por otra parte, en México el propio Presidente Felipe Calderón afirmó recientemente el innegable valor de los fármacos biotecnológicos, indispensables para el tratamiento de numerosos enfermedades que provocan en México, casi el 80 por ciento de los fallecimientos, que permitirá enfrentarse con mayor acierto al enorme desafío para la Salud Pública en el país. Así pues, las empresas farmacéuticas deberán situar en el mercado medicamentos biotecnológicos que cumplan con las máximas normas de calidad, seguridad y eficacia. El Ejecutivo federal aseveró que México se ha situado a la vanguardia mundial en regulaciones de este tipo, para que sus ciudadanos tengan el acceso a lo mejor que el desarrollo científico y tecnológico pueda ofrecer.

He recogido estos dos ejemplos de Iberoamérica, uno académico y otro político, para reafirmar mi plena convicción de creer conocer por donde camina el futuro de la Farmacia.

Otra buena noticia también nos ha llegado de México: el pasado 26 de enero se llevó a cabo el cambio de Consejo Directivo producido en la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas de México. Cesa la AT María Elena Girard, quien impuso la venera de Presidente de la Academia al AT Edwin Raimond-Kedilhac. El organigrama de dicha Academia, en esquema, está formado por el Presidente, 3 Vicepresidentes (Ejecutivo, Científico y Administrativo), el Representante del Consejo de Ex-Presidentes, 6 Directores, 6 Subdirectores y 2 Consejeros (Ética y Editorial).

Debo también transmitirles una triste noticia: don Claudio Sanahuja, que fue Presidente de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Argentina, nos ha dejado definitivamente. Gran amigo de España, de origen catalán, me honró con su amistad; a su adorada Farmacia argentina, a través de la Academia, trató de revitalizarla.

En Febrero de 2012, se desarrolló en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad UPAGU de Cajamarca (Perú) un curso sobre "Iniciativas de formación e Investigación en Atención Farmacéutica", en el marco del convenio vigente entre la UPAGU y la Universidad de Granada (España) y , cuyo objetivo es llevar a cabo las acciones tendentes a desarrollar, de manera conjunta, proyectos académicos, técnicos y científicos que permitan la adquisición de conocimientos y

aptitudes para alcanzar la especialización, que haga posible optimizar las actividades profesionales de los farmacéuticos. Esta iniciativa tiene como finalidad ofrecer de manera conjunta una Maestría en Atención Farmacéutica con el respaldo académico de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, el Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica de la misma Universidad y la Facultad de Ciencias de la Salud de la UPAGU a través de la Escuela de Postgrado de la referida Universidad peruana. El curso estuvo a cargo de docentes de la Universidad de Granada y fue dirigido a farmacéuticos comunitarios, hospitalarios y de atención primaria del Perú.

Asimismo, en Córdoba (España), durante los días 3 y 4 de febrero la Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos (OFIL), tuvo una reunión previa, a fin de preparar el XV Congreso internacional, que concienzuda y minuciosamente se diseñó para reunir en Cádiz a farmacéuticos de ambos mundos con motivo del 200 aniversario de la Constitución de Cádiz, “la Pepa”, aprobada el día de San José de 1812.

En las dos jornadas de Córdoba, también se dedicó una sesión a la atención farmacéutica, con especialistas de Brasil y España, y otra a perfilar al profesional farmacéutico del año 2020, sus desafíos para el futuro, en función de sus conocimientos y habilidades y conocer los paradigmas de la farmacia hospitalaria. También se procedió a la elección de la nueva Junta Directiva de OFIL.

Durante los 3 primeros días de marzo la antigua Real Fábrica de Tabacos de Cádiz, hoy convertido en un magnífico Palacio de Congresos, fue sede del Congreso Internacional de OFIL.

Esta organización nacida hace 30 años, por iniciativa de un profesor universitario colombiano, agrupa a farmacéuticos que tienen su origen en países de habla española o portuguesa .

Su sede operacional, es rotativa, coincidiendo con el país donde radica la presidencia. Su ámbito de actuación incluye 20 países iberoamericanos, además de Portugal y España. Promueve el desarrollo de la profesión farmacéutica en el ámbito académico, hospitalario, comunitario, administración, ..., siguiendo una política de brazos abiertos, para que los pueblos iberoamericanos a los que sirven tengan cada día mejores farmacéuticos, útiles a la sociedad que sirven.

El haber realizado el congreso en Cádiz, no ha sido casual; es una ciudad con sabiduría acumulada, cimentada en más de tres mil años de historia y además este año se celebra el bicentenario de la primera Constitución democrática del mundo hispanoamericano, en la que se inspiraron buena parte de las de nuestra comunidad hispánica. Tampoco es casual que Anastasio Guzmán, ilustre boticario sevillano, fuera el profesor de Botánica del posterior diputado en las Cortes de

Cádiz por Santa Fé de Bogotá, José Mexía Lequerica, quien se unió a los botánicos españoles (peninsulares) que estudiaban la flora de la Real Audiencia de Quito.

Así pues, no es de extrañar que el lema del XV Congreso fuera “Tendiendo puentes, compartiendo experiencias”. Me cupo el honor de abrir las Sesiones, moderando un foro en que 7 ex-presidentes de OFIL, de España, Argentina, Bolivia y Chile, expusieron su visión de las actividades más relevantes desarrolladas en las últimas 3 décadas.

De las diversas sesiones llevadas a cabo destacaré la titulada “Mejorando la eficiencia y la seguridad en el ámbito del medicamento”, en que se presentaron varias ponencias sobre “Los Servicios Farmacéuticos y la seguridad del paciente”, “La política de medicamentos en Centroamérica” y “Los errores de prescripción con medicamentos de alto riesgo”, surgidas del trabajo de colegas de Brasil, Costa Rica y Guatemala.

Otra sesión interesante sobre la Farmacia de ayer y de hoy, contó con presentaciones tales como “Servicios de salud, ciudadano y farmacéuticos”, “Controversias en nutrición parental” o “El uso de plantas como opción terapéutica contra la mordedura de serpientes”, aportadas por especialistas de Portugal, Paraguay y Colombia.

Considero muy importante también otra sesión en que se debatió sobre “La innovación curricular y la calidad de la formación del farmacéutico”, “Los desafíos para la profesión farmacéutica en un mundo cambiante” o “Los requerimientos minerales en pacientes críticos con nutrición parenteral”. Estas aportaciones fueron presentadas por prestigiosos colegas de Chile, Argentina y Portugal.

Un polémico foro de debate surgió tras la aportación del Presidente de OFIL y de las Decanas de las Facultades de Farmacia de Panamá y Puerto Rico, sobre la “Formación asistencial del farmacéutico”, que originó posturas encontradas, fundamentalmente con colegas de España.

También se han de resaltar las conferencias plenarias sobre “El ámbito académico en Iberoamérica” y “Medicina personalizada”.

El congreso contó con la presentación de 53 paneles (de los que se seleccionaron 8 para su presentación oral), divididos en 4 grandes áreas temáticas: Docencia e Investigación Farmacéutica, Tecnología Farmacéutica, Farmacia Asistencial (hospitalaria y comunitaria) y Política de medicamentos, surgidos del trabajo de 132 autores.

Deliberadamente he dejado para el final la reseña de la conferencia inaugural del Congreso de OFIL, titulada: “La historia silenciada: la esclavitud

africana en Iberoamérica”, pronunciada por la Directora de la Academia Sevillana de las Buenas Letras. A todos nos dio mucho en que pensar.

Casi simultáneamente en el tiempo se ha celebrado en Ginebra (Suiza), patrocinado por la Organización Mundial de la Salud, el denominada “Encuentro Internacional de Farmacopeas del Mundo”, del 29 de febrero al 2 de marzo.

La presencia de los representantes iberoamericanos ha sido importante. Deseo destacar las intervenciones del Prof. G. Pianetti, Presidente de la Farmacopea Brasileña, así como la de la Dra. Melina I. Assalone, Secretaria Técnica de la Farmacopea Argentina y del Dr. Ubaldo Juárez Sevilla, de la Farmacopea mexicana (FEUM). Los procesos de armonización en Iberoamérica, están muy presentes a través del Mercado Común del Sur (MERCOSUR). Los representantes de Portugal y España, también tuvieron una destacada actividad.

NOTA NECROLÓGICA

El 30 de diciembre de 2011 falleció la académica correspondiente de esta Corporación, Profesora Rocío Muñoz Calvo. La Dra. Muñoz fue Profesora de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CONCURSO CIENTÍFICO 2011

En la sesión inaugural del curso 2012 de la RANF, se entregaron los Premios del Concurso científico 2011. Los galardonados han sido:

- **PREMIO REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA:** "Silencing Beta 2-Adrenergic Receptors Reduces Intraocular Pressure: A New Approach for Glaucoma Therapy". Jesús Pintor.
- **PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS:** "Potenciación de la actividad antitumoral de doxorubicina mediante su formulación en nanoplataformas magnéticas". José Luis Arias Mediano, Eva Antonia Sáez Fernández, María Adolfinia Ruiz Martínez y Visitación Gallardo Lara.
- **PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID:** "Enfermedad de Chagas: el desenlace de un conflicto entre el parásito y el sistema inmunitario". José Antonio Escario García-Trevijano y Alicia Gómez Barrio.
- **PREMIO CINFA:** "Estudio de utilización de dabigatrán etexilato en pacientes hospitalizados". Cuesta López, Delgado Silveira, Bermejo Vicedo y Benedí González.
- **PREMIO FAES FARMA:** "Diseño de un genosensor electroquímico para la detección indirecta de gluten en alimentos". Begoña Martín Fernández, Carmen Lorena Manzanares Palenzuela, Marta Sánchez-Paniagua López y Beatriz López-Ruiz.
- **PREMIO JUAN ABELLÓ:** "Vidrios mesoporosos bioactivos: implantes y sistemas de liberación de fármacos al servicio de las terapias regenerativas óseas". Daniel Arcos.
- **PREMIO ANTONIO DOADRIO LÓPEZ:** "Desarrollo Farmacéutico de Formulaciones de Poliagregados de Anfotericina B". Ana Cristina Moreno Rodríguez.

SESIONES CIENTÍFICAS

Inauguración del curso académico 2012 de la Real Academia Nacional de Farmacia

El 12 de enero en nuestra Sede, tuvo lugar la solemne sesión inaugural del curso 2012 de la Real Academia Nacional de Farmacia, bajo la presidencia de la Excm. Sra. D^a. M^a. Teresa Miras Portugal, presidente de la Academia. Asistieron al acto numerosas personalidades, entre las que se encontraban: el presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo. Sr. D. Manuel Díaz Rubio, los presidentes de las Academias de Farmacia autonómicas de Cataluña y Galicia y el presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, D. Alberto García Romero. La industria farmacéutica estuvo representada por el presidente de CINFA, D. Enrique Ordieres.

Abrió el acto la presidente de nuestra Academia, que tuvo unas entrañables palabras hacia el Secretario saliente, Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo, y dio una visión general de nuestra presencia en la Sociedad durante el 2011.

A continuación, el Académico Secretario en funciones, procedió a la lectura reglamentaria de la memoria de secretaría, donde destacó nuestras actividades, con un total de 39 sesiones científicas semanales, que fueron distribuidas en 19 tomas de posesión, 11 conferencias, 7 mesas redondas y 2 tertulias científicas, todas ellas retransmitidas en directo y en alta definición por nuestro canal privado de IP TV por Internet, el cual ha sido admitido en el principal portal de TV on line, www.tvgratis.tv, en la sección de ciencia y tecnología, lo que permite verlo en las nuevas televisiones domésticas SMART TV.

Una vez terminada su lectura, el Secretario electo, Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, tomó posesión de su cargo, mediante el acto protocolario de cesión del libro de actas por el Secretario saliente.

Posteriormente, intervino el Excmo. Sr. D. Víctor Jiménez Torres, académico de número, que, en representación de la sección 3^a, leyó el discurso inaugural titulado: "Estrategias para la seguridad del paciente". Como reflexión nos dijo que: "La seguridad del paciente y la mejora del proceso farmacoterapéutico, como dimensiones de la calidad asistencial, deben constituir núcleo de las nuevas responsabilidades del farmacéutico. Además, el fomento de la cultura en seguridad del paciente propicia su participación en la comunicación interprofesional y con los pacientes. En este marco y ante la inevitable implantación de las tecnologías de la información y la comunicación, integradoras de los registros electrónicos de salud, los sistemas informáticos de soporte a las decisiones clínicas, y las medidas de los acontecimientos adversos a los medicamentos, las oportunidades profesionales del farmacéutico son una realidad esperanzadora. Las Facultades de Farmacia, potenciadas por la Real Academia Nacional de Farmacia y las

Organizaciones Profesionales, deberían asumir estas las líneas de acción formativa para los futuros farmacéuticos. Desde esta realidad, no podrán ser excluidos como profesionales de excelencia para la mejora de la seguridad del paciente y garantes de la sostenibilidad del sistema sanitario".

A continuación, se procedió a entregar una medalla de Oro Carracido, nuestra mayor distinción, al escritor farmacéutico D. Raúl Guerra Garrido, el cual dio las gracias a la Corporación por la distinción recibida.

Siguiendo con el orden del día, la presidente de la Academia, entregó dos placas de la Academia, reconocimiento de reciente creación, en agradecimiento a los servicios prestados como Secretario a D. Antonio Doadrio Villarejo y como Presidente de la sección 2ª a D. Juan Ramón Lacadena Calero.

Los actos terminaron con la entrega de los premios del concurso científico 2011 y las tradicionales palabras de la presidente de inauguración del curso en nombre de S. M. el Rey.

*Presentación del libro **The Evolution of Drug Discovery. From traditional medicines to modern drugs***

El pasado 19 de enero, el Prof. Enrique Raviña Rubira, académico correspondiente, presentó su libro: "The Evolution of Drug Discovery. From traditional medicines to modern drugs", editado por Wiley-VCH, en nuestra Sede. Intervinieron en la presentación, además del autor, la Excma. Sra. Dña. Mª Teresa Miras Portugal, Presidente de la RANF y la Excma. Sra. Dña. Carmen Avendaño López, académica de número. La obra representa una nueva versión actualizada de otro libro del profesor Raviña publicado por la USC en 2008 con el título de "Medicamentos", en el que su autor también propone un viaje a lo largo de la evolución histórica de los descubrimientos de fármacos.



*Conferencia **el papel del macrófago en la regulación de la respuesta inflamatoria***

El pasado 2 de febrero, nuestro académico correspondiente Ilmo. Sr. D. Lisardo Boscá Gomar, pronunció una conferencia, titulada: "Papel del macrófago en la regulación de la respuesta inflamatoria". Lisardo Boscá, es Profesor de Investigación y Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

(CSIC).

En su exposición, nos habló de que uno de los avances conceptuales más recientes en el campo de la patología ha sido considerar la reacción inflamatoria como causa relevante en el desarrollo de enfermedades tan distintas como cáncer, neurodegeneración o la enfermedad cardiovascular. En este sentido, la identificación de las bases moleculares de los mecanismos inflamatorios así como de los procesos que conducen a su resolución han permitido poner de manifiesto parte de las alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de procesos ateromatosos, y en definitiva, en la enfermedad cardiovascular.

La regulación de estos mecanismos caracterizados en roedores en primates está siendo objeto de estudio debido a la complejidad de la regulación de los genes de PPAR y LXR en humanos, donde se han descrito dos formas de corte/empalme alternativos así como polimorfismos que afectan a su capacidad de transcripción y transrepresión de genes diana. Estudios en este sentido, no solo permitirán entender las bases moleculares de los procesos aterogénicos en humanos, sino que constituirán la base para intervenciones farmacológicas y evaluación de riesgo de enfermedad cardiovascular .

Mesa redonda sobre el Balneario "El Raposo"

El día 9 de febrero de 2012, se celebró en nuestra Sede una mesa redonda organizada por la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el Balneario de El Raposo, en Badajoz. En ella, intervinieron la Académica de número Excm. Sra. Dña. M^a. del Carmen Francés Causapé y los Académicos



correspondientes D. Miguel Ladero Álvarez y Dña. Carmen de la Rosa Jorge, los cuales dieron cuenta de los estudios realizados en el balneario. La Dra. Francés habló sobre la "Historia y generalidades del Balneario". El Dr. Ladero expuso su trabajo: "Estudio de la vegetación del entorno de las aguas del Balneario" y la Dra. de la Rosa hizo lo propio sobre su: "Estudio Microbiológico de las aguas del Balneario".

El Balneario El Raposo es un centro termal situado en la localidad El Raposo, en la provincia de Badajoz. Es uno de los balnearios de Extremadura y se caracteriza principalmente por la aplicación de lodos naturales, siendo uno de los pocos balnearios en España que cuentan con dichos lodos naturales.

Conferencia Iniciación de la señalización por el receptor TCR: modelo de discriminación inmune entre lo propio y lo extraño



El pasado jueves 23 de febrero, el Profesor Balbino Alarcón del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, pronunció una interesante conferencia titulada: "Iniciación de la señalización por el receptor TCR: modelo de discriminación inmune entre lo propio y lo extraño".

Balbino Alarcón nació en Almería en 1960, terminó su licenciatura en Bioquímica en la Universidad Autónoma de Madrid en 1982 y obtuvo su doctorado en Biología en 1985 en la misma universidad.

Desde el 2002 es Profesor de Investigación del CSIC en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, centro donde ha realizado sus investigaciones desde 1990. En este tiempo se ha dedicado a descifrar los mecanismos moleculares más tempranos en la transmisión de señales por parte del receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR).

En su disertación nos dijo que los linfocitos T reconocen a los antígenos en la forma de pequeños péptidos anclados en una cavidad que tienen las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC en inglés). Estos complejos péptido antigénico/MHC (que denominamos pMHC) está presentes en la membrana plasmática de las células reconocidas por los linfocitos T (células presentadoras de antígeno) y constituyen el ligando del receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR). Existe una paradoja en el reconocimiento de pMHC por el TCR.

Los linfocitos T muestran una gran especificidad para el antígeno y son además muy sensibles, es decir son capaces de detectar cantidades muy pequeñas de su ligando pMHC específico. Estas propiedades las ejercen a través de un receptor, el TCR, que tiene una afinidad bastante modesta por su pMHC (entre 10^{-6} y 10^{-5} M).

NOTICIAS DESTACADAS



Mª Teresa Miras, académica de número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias

La Presidente de nuestra Academia, Excma. Sra. D^ª. M^ª. Teresa Miras Portugal tomó posesión de su plaza de Académica de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias, el lunes 23 de enero, en la Sede de la misma. Su discurso de entrada se tituló: "Importancia de los modelos animales en el estudio del sistema purinérgico", que fue contestado por el Presidente de la R. A. de Ciencias Veterinarias, Excmo. Sr. D. Arturo Anadón.

En el discurso de la Dra. Miras, se evidencia que su grupo de investigación ha utilizado modelos de animales normales y modificados, respetando la ética de experimentación animal, así como técnicas de biología y genética molecular y receptores. A lo largo de su intervención, describe las especies y estirpes de animales y las partes de los mismos estudiadas, tales como órganos, tejidos y células.

A continuación, hizo una breve historia de los primeros compuestos purinérgicos y pirimidenérgicos, con una mención especial al modelo de los perros dálmatas y a los cien años de estudio para comprender la excreción del ácido úrico. El perro dálmata no es capaz de metabolizar el ácido úrico, a diferencia de otras razas de perros y similar al humano.

El interés científico por el sistema purinérgico, se basa en ser un factor esencial en la comunicación celular.



El Académico José Miguel Ortiz Melón, medalla de plata de la Universidad de Cantabria

El académico de número, Excmo. Sr. D. José Miguel Ortiz Melón, fue galardonado con la medalla de plata de la Universidad de Cantabria, de la que fue Rector. El Profesor Ortiz Melón, junto al Profesor Luis Gaspar Vega Argüelles, recibió la Medalla de Plata de la Universidad de Cantabria en el

transcurso de la solemne ceremonia conmemorativa de Santo Tomás de Aquino, patrón de la Universidad. La entrega de esta importante distinción se hacía tras su aprobación en Consejo de Gobierno, a propuesta del Departamento de Biología Molecular. José Miguel Ortiz Melón es doctor en Farmacia y Catedrático de la Facultad de Medicina de la UC constituyendo una pieza clave en la enseñanza de la Bioquímica y Biología Molecular donde ha formado a cerca de una treintena de promociones de médicos. Fue Rector Magnífico de la Universidad de Cantabria entre 1980 y 1984.



Javier Puerto, Académico de número electo de la Real Academia de la Historia

Nuestro Académico de número Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, ha sido elegido el pasado 3 de febrero, académico de número de la Real Academia de la Historia. El Profesor Puerto es Doctor en Farmacia y un eminente catedrático de Historia de la Farmacia en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. El Dr. Puerto es un humanista consagrado y un excelente novelista. La Real Academia de la Historia, como así lo hizo previamente nuestra Academia ha querido premiar su extraordinaria trayectoria de plena dedicación a la Historia de la Ciencia y de la Farmacia en particular.

El Dr. Puerto es el Director del Museo de la Farmacia Hispana que está ubicado en la Facultad de Farmacia de la UCM y es el actual Conservador de nuestro museo y Bibliotecario de nuestra Corporación.

Ocupará la medalla nº 14. La candidatura fue presentada por Don José Alcalá Zamora, Don Faustino Menéndez Pidal y Don Carlos Martínez Shaw.

Fidel Ortega, elegido Decano de la Facultad de Farmacia de la UAH



Nuestro académico de número, Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Díaz de Apodaca, ha sido elegido Decano de la Universidad de Alcalá de Henares el pasado mes de febrero. Este es su segundo mandato, ya que lo fue de 2000 a 2008, cesando al haber cumplido sus dos periodos reglamentarios. El Prof. Ortega, trabajó con el Prof. Lo Gorton en el Departamento de "Analytical Chemistry" en el "Chemical Center" de la Universidad de Lund (Suecia), grupo puntero en la investigación con biosensores electroquímicos. Es doctor en Farmacia y actualmente es profesor titular del

Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá de Henares.

Bartolomé Ribas, medalla Ritterstern



Al académico de número de nuestra Corporación, Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, le ha sido entregada en Paris la medalla Ritterstern de la Europäische Akademie der Naturwissenschaften de Hannover, el pasado mes de febrero. La Academia Europea de Ciencias Exactas y Naturales (EANW - EAEN) que tiene su sede en Hannover, Alemania, está en estrecho contacto con asociaciones similares y academias, en especial con la "Sociedad Científica Europea" y la Academia Rusa de las ciencias naturales.

El Dr. Ribas es el actual Académico Secretario de la Academia y Director de los servicios de publicaciones de la misma. El Prof. Ribas es doctor en Farmacia y fue Profesor de investigación del CSIC.

Nicholas Peppas, Samuel Stupp y Ruth Duncan, elegidos académicos correspondiente extranjeros

Los eminentes científicos Profesores Nicholas A. Peppas, Samuel Stupp y Ruth Duncan, han sido elegidos académicos correspondientes extranjeros de nuestra Corporación.

Nicholas A. Peppas es Doctor en Ingeniería Química por el Instituto de Tecnología de Massachussets y se ha especializado en ingeniería biomédica. El trabajo de Peppas se dirige hacia la investigación de las biomoléculas y los biomateriales para erradicar enfermedades como el cáncer o la diabetes así como otras aplicaciones para la mejora de la calidad de vida de los enfermos de esclerosis múltiple, entre otros casos. El Dr. Peppas es Director del Laboratorio de biomateriales, liberación de fármacos, bionanotecnología y reconocimiento molecular y profesor del departamento de ingeniería biomédica de la Universidad de Texas, EE.UU.

La Dra. Duncan es profesora emérita de biología celular y liberación de fármacos en la Welsh School of Pharmacy, de la Universidad de Cardiff, en el Reino Unido, y profesora visitante del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), ubicado en Valencia. Fue fundadora y directora hasta fechas recientes del Centro for Polymer Therapeutics. Su investigación ha transferido 6 conjugados polímero

anticancerígeno a ensayos clínicos y los primeros 2 agentes para imagen en cámara gamma basados en polímeros.

El Dr. Samuel Stupp pertenece al Departamento de Química Ciencia de Materiales e Ingeniería la Universidad de Missouri en Kansas, EE.UU. y Director del Northwestern's Institute for BioNanotechnology in Medicine. Su investigación se centra en autoensamblaje y materials supramoleculares con especial énfasis en la medicina regenerativa, las terapias para el cáncer y la energía solar.

Los Drs. Peppas, Duncan y Stupp tomarán posesión de sus plazas en el mes de abril de este año.

RECEPCIÓN DE ACADÉMICOS DE LA RANF

Toma de posesión del Ilmo. Sr. D. Sebastián Cerdán como Académico Correspondiente



En sesión solemne celebrada el 26 de enero de este año, el Dr. Sebastián Cerdán García-Esteller, tomó posesión de su plaza de académico correspondiente, con su discurso, titulado: "Resonancia magnética y biomedicina". Le presentó en nombre de la Corporación el Académico de Número Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo, compañero de curso del Dr. Cerdán.

Sebastián Cerdán García-Esteller, es Profesor de Investigación de la Agencia Estatal CSIC y responsable del Laboratorio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo (LIERM) del CSIC desde 1989. Doctor en Farmacia con Premio Extraordinario (1978), su trayectoria científica involucra estancias postdoctorales en los Estados Unidos (Universidad de Pennsylvania, John E. Fogarty International Fellow) y en Suiza (Biozentrum der Universität Basel, EMBO Long Term Fellow). Es autor de ciento veinticinco artículos de investigación, doscientas cincuenta comunicaciones a congresos, más de una docena de capítulos de libros y cinco patentes. Ha dirigido dieciséis Tesis Doctorales, tanto en Universidades Españolas, como Extranjeras.

Entre sus contribuciones científicas más relevantes destacan la caracterización de la interacción metabólica entre neuronas y células de glía en el cerebro adulto, el desarrollo de espectroscopías multinucleares para estudios metabólicos y más recientemente el desarrollo de nuevas series de agentes de contraste para espectroscopía e imagen por Resonancia Magnética. Actualmente, es Editor Asociado de revistas de difusión internacional de RM Biomédica (NMR in Biomedicine), de bioenergética cerebral (Frontiers in Neuroenergetics), ha sido Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC/UAM, Secretario de la Sociedad de Biofísica de España (1996-2002), Vocal y Presidente de la Sociedad Europea de Resonancia Magnética ESMRMB (1996-2000, 2004-10), miembro del Consejo Directivo (Board of Trustees) de la Sociedad Internacional de Resonancia Magnética en Medicina ISMRM y, a partir de hoy, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia en España (RANF).

En la actualidad forma parte de Unidad Mixta de Imagen Molecular, un recurso combinado de la Universidad Nacional de Educación a Distancia y del CSIC

que alberga el Servicio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo (SIERMAC, <http://www.siermac.es>), una de las instalaciones más avanzadas del país, con scanners de 7 y 11,7 Tesla, entre otros y una empresa spin-off, SOIREM Research Ltd., encargada de proteger los derechos de propiedad intelectual generados por la unidad, así como de comercializar los productos y servicios generados.

Toma de posesión del Ilmo. Sr. D. José Antonio Rodríguez Montes como Académico Correspondiente



El pasado 16 de febrero, en sesión solemne de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Dr. José Antonio Rodríguez Montes, tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente. La Corporación acoge así en su seno, a este prestigioso médico cirujano, Jefe del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario La Paz de Madrid y Catedrático de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid.

Fue presentado por el Académico Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza en nombre de la Academia.

El Dr. Rodríguez Montes es Licenciado y Doctor en Medicina y Cirugía con Premio Extraordinario por la Universidad de Granada y Diplomado en Nutrición por la misma Universidad.

Fue Becario Postdoctoral en el extranjero del MEC en la Universidad de Cambridge, UK y, Medecin Resident Etranger des Hôpitaux de Paris; Decano de la Facultad de Medicina de la UAM; Director de 84 tesis doctorales; Autor de 12 libros, 123 capítulos de libros, 220 artículos en revistas indexadas y de más de 450 Comunicaciones y Ponencias a Congresos Nacionales e Internacionales.

Es además, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Medicina y de las Reales Academias de Medicina de Valladolid, Murcia, Andalucía Oriental y Malagueña de Ciencias. Está en posesión de la Medalla de Oro de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Su discurso de ingreso versó sobre la "Evolución y Revolución de la Cirugía", donde nos hizo un recorrido de la evolución de la cirugía desde la antigüedad hasta los tiempos actuales, pasando por la edad media, la moderna y la contemporánea, señalando los acontecimientos más importantes, el período en el que tuvo lugar el nacimiento histórico de la Cirugía como Ciencia y como se ha desarrollado hasta la actualidad.

Finalmente, el Dr. Rodríguez Montes nos habló del futuro que le espera a la cirugía y sus predicciones personales basadas en tres componentes: la mano del cirujano, las nuevas tecnologías instrumentales y la atención al paciente.

Una vez concluida su interesantísima y amena disertación, la Presidente de la Academia, le impuso su medalla en nombre de S. M. el Rey.

Edición de noticias cerrada el 29 de febrero de 2012.

PRÓLOGO

Nuestra Corporación inicia oficialmente sus actividades correspondientes al Curso 2011 con la Solemne Sesión Inaugural, en este caso celebrada el 13 de enero, bajo la presidencia de la Excma. Sra. D^a M^a Teresa Miras Portugal, Presidente de la Academia. Estuvieron presentes, el Presidente de la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando y los Presidentes de las Academias de Farmacia Autonómicas de Aragón, Cataluña y Región de Murcia.

El discurso inaugural estuvo a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, en representación de la sección segunda, con el título de: “Genética y Sociedad”. El Dr. Lacadena, destacó que el descubrimiento del ADN marca un antes y después en la ciencia y la sociedad y señaló que las tres letras de su discurso, encierran la gran revolución científica de las últimas décadas y que la del ADN está produciendo una biocracia a través de la Biotecnología, considerándola como la piedra filosofal de la Biología.

DE LOS ACADÉMICOS

RECEPCIONES DE ACADÉMICOS

De nuevo, durante el año pasado ha tenido lugar la incorporación de nuevos miembros a nuestra Corporación.

Como Académico de Honor, el 10 de noviembre se unió a nuestra Academia el conocido y reputado científico Excmo. Sr. D. Mariano Barbacid, jefe del Grupo de Oncología Experimental del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), quién leyó su discurso titulado: “De la oncología molecular a la terapia individualizada: impacto en la práctica clínica”. Le contestó en nombre de la Corporación el Académico de Número Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

Durante el pasado curso, asistimos a 3 sesiones solemnes de recepción de académicos de número. La Excma. Sra. D^a. Rosa Basante Pol, Profesora de Historia y Legislación de la UCM, tomó posesión el 28 de abril de la medalla nº 23, leyendo su discurso reglamentario titulado: “Reflexiones en torno al medicamento y sus profesionales”, que fue contestado por el académico de número Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento. El 20 de octubre, lo hizo el Excmo. Sr. D. José

M.^a Medina Jiménez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, en la medalla nº 29, con su discurso: “La albúmina sérica: una posible arma terapéutica en la enfermedad de Alzheimer y el Síndrome de Down”, contestado por el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza y el 27 de octubre en la medalla 42, tomó posesión la Excma. Sra. D.^a. María Vallet Regí, Catedrática de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la UCM, con la lectura del discurso de ingreso: “Fármacos, Nanomedicina y Biomateriales: Un objetivo común”, contestado por el que suscribe.

Se produjeron tres tomas de posesión de académicos correspondientes extranjeros, la de la Dra. Maiken Nedergaard, Decana de la Facultad de Medicina de Rochester (Estados Unidos); la de Clément Sánchez, miembro del Collège de Francia y la de Christoph Friedrich, Profesor de Historia de la Farmacia y Director del Instituto Für Geschichte (Für gessischoit) de Farmacia.

Asimismo, se dispusieron 12 tomas de posesión de académicos correspondientes nacionales, la de los Dres. Antonio González Bueno, Isaac Arias Santos, José María Ordovás Muñoz, Lina Badimón Maestro, Antonio Jesús Salinas Sánchez, Ángela María Martínez Valverde, M.^a Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, Carmen Aragón Rueda, José Javier Lucas Lozano, Josep Ventura, María Molina Martín y Pedro Guillén García.

Todos ellos nos deleitaron con unos magníficos discursos de entrada, la mayoría en forma de conferencias multimedia, que dieron un extraordinario nivel científico a nuestra Corporación.

ELECCIONES DE ACADÉMICOS

El 25 de noviembre fue elegida por el Pleno de la Corporación, académica de honor la Dra. Consuelo de la Torre García-Quintana, primera mujer en ocupar esa consideración en nuestra Academia.

Abierta durante el curso la admisión de nuevos académicos correspondientes nacionales, la Junta de Gobierno eligió por unanimidad y después de cumplir los trámites regulados en la convocatoria a los siguientes doctores: Eduardo Costas Costas, Manuel Esteller Badosa, María Blasco Marhuenda, Antonio Alcamí Pertejo, Cecilio Giménez Martín, Antonio Rabasco Álvarez, Mercedes Salaiques Sánchez, Rosa M.^a. Ortega Anta, José López Guzmán y José Carlos Rodríguez Rey. También y elegidos por la Junta General lo fueron los Dres. Honorio Bando y José Manuel Arias de Saavedra.

ELECCIONES DE CARGOS ACADÉMICOS

Durante el año 2011, y como es reglamentario, han sido elegidos nuevos cargos, en este caso de secretario y tesorero de la Academia. Para el de Tesorero, elegimos al Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, el académico varón mas joven, solo superado en 7 días por nuestra académica M^a José Alonso, en sustitución del Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, que resultó electo para el cargo de Académico Secretario, en reemplazo del que suscribe, que cumplió sus dos mandatos reglamentarios. Para referirme a él y definir su espíritu, nada mejor que estas palabras de Will Rogers: “Es grande ser grande, pero es mayor ser humano”. Le deseo suerte, en un cargo complicado, donde no basta solo el esfuerzo y la dedicación, sino que hay que complementarlo con mucho tacto y ciertas dosis de prudencia.

Después de 6 años de mandato y otras tantas memorias de secretaría, al llegar a este punto de redacción he pensado en decir unas palabras de despedida, pero no es oportuno, lo que si quiero manifestar en 4 palabras es mi principal sentimiento: “He—sido—muy- feliz” y por ello quiero dar las gracias a todos mis compañeros académicos que lo han hecho posible. “Demos gracias a los hombres y a las mujeres que nos hacen felices, ellos son los encantadores jardineros que hacen florecer a nuestros espíritus” (Will Rogers).

También, y durante el mes de diciembre fueron elegidos o reelegidos los Presidentes de las secciones, quedando su composición como sigue: Sección 1^a, Dr. Antonio Monge Vega (reelegido); Sección 2^a, Dr. Antonio R. Martínez Fernández, elegido en sustitución del Dr. Juan Ramón Lacadena Calero que cesa por mandato reglamentario al cumplir dos consecutivos; Sección 3^a, Dr. D. Víctor Jiménez Torres, electo en sustitución del Dr. José Luis Vila, recientemente fallecido; Sección 4^a, Dr. Juan Tamargo Menéndez (reelegido); Sección 5^a, Dr. Mariano Esteban Rodríguez (reelegido) y Sección 6^a, Dr. César Nombela Cano (reelegido).

NECROLÓGICAS DE ACADÉMICOS

Durante el curso 2011, tuvimos que lamentar las perdidas de nuestros académicos de número Excmos. Sres. D. Guillermo Tena Núñez y D. José Luís Vila Jato y de la académica correspondiente, Ilma. Sra. D^a Rocío Muñoz Calvo.

Recordemos su vida como una lección aprendida, velando con cariño a los que quedaron al borde del camino. Despidamos a nuestros seres queridos, que otra vida les espera, más allá de estas barreras, cruzarán la frontera y seguirán su destino.

HONORES A ACADÉMICOS

En un año, en el que celebramos la concesión del Premio Nobel de Química a Marie Curie, cuyo reconocimiento científico, según nos describió la Dra. Ana Pascual-Leone, no fue precisamente sencillo y si excepcional, ya que históricamente las mujeres, aunque han contribuido a la ciencia desde civilizaciones muy tempranas -como ejemplo, Merit Ptah (2.700 a. C.), fue descrita en una inscripción egipcia como "médico principal"- pero que no han tenido su merecido reconocimiento, he elegido para comenzar y como muestra intencionada a 3 de nuestras académicas de número, por la relevancia de sus premios de investigación conseguidos durante el 2011. Por orden de antigüedad, como es consuetudinariamente académico: M^a Teresa Miras Portugal, Premio "Miguel Catalán" de la Comunidad de Madrid, M^a José Alonso, Premio Jaime I en nuevas tecnologías y Premio Nóvoa Santos, y María Vallet Regí, Premio de investigación y medalla de oro de la Real Sociedad Española de Química. Afortunadamente, estas tres señaladas científicas si que han tenido reconocimiento a sus bien ganados méritos y también afortunadamente esas barreras históricas en la Ciencia, han desaparecido o están caducas, gracias en gran parte, a mujeres que han luchado para ello, unas reconocidas, como Marie Curie y otras no tanto, pero que con su callado esfuerzo han hecho mas fácil el camino.

Para ellas y para los demás galardonados, nuestra mas calurosa felicitación por las distinciones que les han sido concedidas y que paso a describir.

El 13 de diciembre, se celebró el tradicional acto anual de homenaje a la antigüedad académica en el Instituto de España, que recayó en nuestro compañero, el académico de número y decano de nuestra Academia, Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez. La *laudatio*, estuvo a cargo del Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, quien destacó la profesionalidad del homenajeado y su calidad científica, que le ha llevado a ocupar un primer puesto mundial en la geobotánica. En el acto, se le entregó una placa conmemorativa por parte del actual presidente del Instituto de España y de la Real Academia de la Historia, Excmo. Sr. D. Gonzalo Anes y Álvarez de Castrillón.

El 7 de noviembre el Profesor Benito del Castillo fue nombrado Profesor Honorario de la Universidad de Cajamarca-Perú.

El Profesor D. Juan-Ramón Lacadena Calero ingresó en el Colegio Libre de Eméritos en el mes de abril.

El profesor Juan Tamargo fue nombrado miembro del Comité Editorial de las revistas: World Journal of Pharmacology, Arrhythmia and Electrophysiology Review, Cardiovascular Drugs and Therapy y Arrhythmia and Electrophysiology. Además, el Handbook of Drugs in Cardiology, del que es coautor, ha recibido el Premio al mejor libro de Farmacología en 2010 en

Inglaterra y es uno de los cuatro autores europeos invitados a escribir las Guías de fibrilación auricular del American College of Cardiology/American heart Association.

DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA

La actividad científica de la Academia, se puede cuantificar en un total de 39 Sesiones Científicas semanales, 7 más que el curso pasado, que fueron distribuidas en 19 Tomas de Posesión, 11 conferencias, 7 Mesas Redondas y 2 tertulias científicas, todas ellas retransmitidas en directo y en alta definición por nuestro canal privado de IP TV por Internet, el cual ha sido admitido en el principal portal de TV on line, www.tvgratis.tv en la sección de Ciencia y tecnología, lo que permite verlo en las nuevas televisiones domésticas SMART TV.

En un año donde se celebró internacionalmente, el de la Química, el Centenario de la concesión del Premio Nobel de Química a Madame Curie y el Año del Cerebro, nuestra Academia estuvo presente organizando una mesa redonda sobre el Año Internacional de la Química, una sesión conmemorativa del Premio Nobel a Madame Curie, presentada por nuestra académica Dra. Ana Pascual-Leone y en la que el Dr. José Luis Moreno Frigols, académico correspondiente, nos deleitó con su conferencia titulada: “Radiofármacos: Perspectivas actuales”, además de 2 tertulias y una mesa redonda sobre el cerebro.

También, organizamos las mesas redondas sobre “patologías duales”, con la presencia del presidente de la Sociedad española de patología dual, Dr. Nestor Szman y la Dra. M^a Isabel Collado, catedrática de farmacología de la UCM; la de “calidad farmacéutica”, con la participación de D. Ramón Esquerdo López, Director Técnico de Laboratorios Menarini y D. Francisco Salmerón García, Jefe de División de Productos Biológicos y Biotecnología de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; la de “Biotecnología en terapéutica”, con Carmen Acebal Sarabia, Vicerrectora de Investigación y Política Científica de la UCM y Dña. Carmen Vela Olmo, Directora General de INGENASA (Inmunología y Genética Aplicada, S.A.) y actual Secretaria de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación; la mesa redonda de “Empresa farmacéutica. Siglo XXI”, con D. Enrique Ordieres, Presidente de Laboratorios CINFA y Dña. Elvira Sanz, Presidente de Laboratorios PFIZER; la de “Seguridad del paciente oncológico”, con la colaboración de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y la “Conmemorativa del Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2011”, con la presencia del Prof. Dr. Francisco Sánchez Madrid, Catedrático de Inmunología en la Facultad

de Medicina de la UAM, que pronunció una extraordinaria conferencia titulada: “Avizores del sistema inmunitario”.

DE LAS PUBLICACIONES

En el capítulo de publicaciones y de nuevo, debido al recorte presupuestario oficial, fue preciso limitar el número de aquellas, aún así editamos 1 monografía, la 32, titulada: “Memorias de Secretaría: 1932-2010”, un número de la comisión de aguas minerales y mineromedicinales sobre el “Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya (Albacete)”, editado por el Académico Bernabé Sanz Pérez y 4 números de los Anales. Además, el académico Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, catedrático de Historia de la Farmacia, terminó su obra: “Historia de la Real Academia Nacional de Farmacia”; extraordinaria y monumental obra que le ha costado 3 años de esfuerzo y que en sus 746 páginas y 121 imágenes, nos relata con su habitual estilo coherentemente literario nuestro caminar en el tiempo, desde 1932 a 2000, con sus antecedentes desde la Congregación del Señor San Lucas y Nuestra Señora de la Purificación, a partir del 16 de noviembre de 1589 y que será editada por el servicio digital de nuestra Academia y la Fundación José Casares Gil en los próximos días.

Desde el volumen 77, nº1, primero del año 2011, los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, se dejaron de editar en papel, para pasar a formato digital, manteniendo su presencia on line en el Open Journal System, lo que permite su indexación en el ISI Web Knowledge. La edición digital en un moderno formato de libro electrónico en soporte de CD-Rom, para su distribución y en formato html, para su presencia en la red a través de nuestro portal de publicaciones, nos ha permitido reducir los gastos de la publicación en una cantidad superior a los 30.000 € anuales, a la vez que su difusión es mucho mayor, de casi 14.000 lectores, frente a los 300 de la distribución en papel. No obstante, para su consulta en nuestra biblioteca, se ha dispuesto de la edición de 2 ejemplares de cada volumen en impresión tradicional.

La Fundación Casares Gil como es habitual, vuelve a estar presente en estas actividades de la RANF, destacando su patronazgo en las mesas redondas que ha celebrado la Academia.

DE LA BIBLIOTECA

En el segundo año del proyecto de digitalización de nuestra Biblioteca virtual para los libros de los siglos XVI a XIX, con la subvención del Ministerio de Cultura y el patrocinio de la Fundación José Casares Gil, se han elaborado 234 obras, equivalentes a 94.000 imágenes aproximadamente. En total, ahora mismo se pueden consultar 319 obras, todas a través de nuestro Catálogo virtual y en los repositorios digitales colectivos Hispana y Europea.

La digitalización de los libros del s XIX ha sido aceptada para 2012 por el Ministerio de Cultura con la concesión de una nueva ayuda.

Dentro del Proyecto de Recuperación, catalogación, digitalización y archivo del fondo fotográfico antiguo de la Academia, Se han catalogado y digitalizado 350 fotografías de los siglos XIX y XX, que se pueden visualizar en la Biblioteca virtual.

Se ha restaurado el herbario de 1805: "*Plantarum Hispaniae indigenarum centuria*". Se han digitalizado los Anales desde 1932 y se han catalogado 857 nuevos registros y 2.900 han sido modificados o mejorados.

El Instituto de España ha donado 25 monografías faltantes en nuestra colección y el académico Bernabé Sanz Pérez diversos ejemplares de la revista Food Technology.

DE LA COOPERACIÓN EXTERNA

La cooperación que hemos mantenido con los Laboratorios Lilly durante el año 2011, fructificó en la firma de un importante convenio de cooperación entre esta Academia y la farmacéutica para el apoyo a nuestras actividades.

La colaboración con el Instituto Tomás Pascual para la nutrición y la salud, a través de convenio, resultó muy intensa en el pasado curso, en especial con la impartición del primer curso on line desde nuestro recién creado campus virtual, titulado: "Educación sanitaria e interrogantes en patologías para la Oficina de Farmacia", dirigido a farmacéuticos y profesionales sanitarios, que se celebró de marzo a diciembre. El curso resultó de gran éxito, con una participación de 676 alumnos farmacéuticos y 62 de otras profesiones, que recibieron su diploma probatorio después de superar las pruebas correspondientes y que fue acreditado por la Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud con 5,7 créditos.

Un año mas, en este caso el 21 de marzo, tuvo lugar en la Casa Iberoamericana de Cádiz la entrega de los Premios Cortes de Cádiz. Presidió el acto la Excm. Sra. Doña Teófila Martínez, Alcaldesa de Cádiz, asistiendo en la presidencia Don Enrique V. Iglesias, Secretario General Iberoamericano y Doña Judith Pinedo Alcaldesa de Cartagena de Indias. El Premio Iberoamericano de Botánica, patrocinado por nuestra Academia, fue entregado a la Dra. María Amelia Martins Loução, tras la *laudatio* pronunciada por nuestro Vicepresidente Dr. Antonio Ramón Martínez. La obra presentada desde la Facultad de Biología de la Universidad de Lisboa destacaba sobre las restantes. Por otra parte, se daba la feliz circunstancia de que la autora era ya bien conocida en la Academia, ya que es uno de los académicos correspondientes de nuestra Academia en Portugal.

El 9 de Mayo la revista "Muy Interesante" con motivo de su 30º Aniversario, celebrado en el Museo de ABC, concedió los Premios Innovación 2011 a los Dres. Dña. M^a José Alonso Fernández, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y a D. Mariano Barbacid, Académico de Honor electo de la misma.

El pasado 5 de Mayo, durante la celebración del IV Encuentro de la Asociación Internacional de Academias de Farmacia (AIAF) la Excm. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, fue nombrada Académica de Honor de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina. Le impuso la medalla el Presidente de la misma D. Carlos María Baratti, con la presencia de los Académicos D. Manuel R. Limares y D. Marcelo Squassini.

El 13 de mayo se celebró, en el Paraninfo de la Universidad de Salamanca, el solemne acto de imposición de medallas de Académicos de Honor a nuestros académicos Excmos. Sres. D. Julio Rodríguez Villanueva y D. José Antonio Fernández del Campo.

El 6 de mayo, tuvo lugar la toma de posesión como Académico Correspondiente de la Academia Santa María de España de la Región de Murcia, de nuestro Académico de Número el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo, con el discurso titulado: "Instrumentos científicos de la colección histórica del Museo de la Farmacia Hispana de Madrid". El acto se celebró durante la IV Reunión de la Asociación Iberoamericana de Academias de Farmacia (AIAF) en Cartagena (España). Asimismo, el 6 de septiembre, lo hizo el que suscribe. Fue presentado por la Académica de Número, Ilma. Sra. Doña María Cecilia Moreno Bejar. Su discurso de ingreso se tituló: "Modelos Climáticos: Predicciones de un Cambio Climático Global". El acto se cerró con la intervención del Presidente de la Corporación Murciana, Excmo. Sr. Dr. D. Pedro Martínez Hernández.

El académico correspondiente Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, ha sido nombrado "Hijo Adoptivo de la villa de Laredo" (Cantabria) por el Pleno Municipal del Ayuntamiento. El acto de entrega se celebró el 29 de octubre.

El académico correspondiente D. José María Suñé Arbussá, recibió el 30 de mayo en un solemne acto celebrado en la Real Academia de Farmacia de Cataluña, de manos de la Excma. Sra. D^a María del Carmen Francés Causapé, la "Medalla "Carmen Francés" de la Academia Internacional de Historia de la Farmacia, en su posición como Presidente de Honor de esa institución. Asimismo el día 22 de octubre recibió una placa de plata con que le rindió homenaje la Real Academia de Farmacia de Cataluña por su labor en relación con las Concordias de Barcelona del siglo XVI.

EPÍLOGO

Por último, tenemos que hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación por las subvenciones concedidas en el Curso 2011, que nos han permitido acometer las actividades programadas. También, deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos los patrocinadores del Concurso Científico y a la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación.

Una vez mas, esta Real Academia Nacional de Farmacia, ha comparecido para dar cuenta pública de sus Actividades, de las que yo, "is etiam scriptor per postremus" (el todavía Secretario por última vez), doy fe.

Muchas gracias por su atención.

Presente y Futuro en el Descubrimiento de Fármacos para la Enfermedad de Chagas

Nuria E. Campillo, Pedro González-Naranjo, Juan Antonio Páez *

Instituto de Química Médica. CSIC. Juan de la Cierva 3, 28006-Madrid. España.

Recibido el 31 de octubre de 2011.

e-mail: jpaez@iqm.csic.es

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria causada por el *Trypanosoma cruzi*. Se estima que alrededor de 7,7 millones de personas se encuentran infectadas y padecen la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad silenciosa que esta estrechamente relacionada con la pobreza, es transmitida a los humanos por unos insectos que se encuentran exclusivamente en el continente americano, principalmente en áreas rurales con muy deficientes condiciones de salubridad. Los fármacos existentes (nifurtimox y benznidazol), no siempre disponibles, constituyen un tratamiento paliativo, pero no curan la enfermedad y no son aceptables desde un punto de vista terapéutico debido a sus efectos secundarios indeseables y a su falta de eficacia. Por tanto, es necesario el desarrollo urgente de nuevos tratamientos y por tanto, sería muy conveniente la utilización del diseño racional en todas las etapas. El diseño de fármacos es una tarea compleja que requiere la colaboración interdisciplinar de muchos especialistas en diferentes campos de la ciencia. El presente trabajo describe de manera estructurada las diferentes estrategias que se han utilizado y las que se pueden utilizar en el futuro para el descubrimiento de nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas. Se recogen las estrategias más clásicas como el diseño de análogos, el cribado sistemático o el basado en la información biológica y los métodos más novedosos basados en lo que se conoce como quimioinformática.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas; *T. cruzi*; QSAR; Quimioinformática; Cribado virtual; Redes neuronales; Anclaje.

ABSTRACT

The Present and Future of Drug Discovery for Chagas Disease

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is caused by infection with the *Trypanosoma cruzi*. The Pan American Health Organization (PAHO) estimates that 7.7 million persons currently have *T. cruzi* infection in the 21 endemic countries. This disease can be transmitted to humans by insect vectors that are found only in the American continent, mainly, in rural areas with unhealthy housing conditions where poverty is a general concern. Nifurtimox and benznidazole are the only drugs used against this disease, but sometimes they are not available. The treatment of Chagas disease with nifurtimox or benznidazole is unsatisfactory because of their limited efficacy on the prevalent chronic stage of the disease and their toxic side effects.-It is, therefore, necessary the development of new effective antichagasic drugs for the suitable treatment of this disease. The development of new drugs for Chagas disease requires a multidisciplinary approach involving diverse disciplines such as molecular and cellular biology, chemistry, bioinformatics, biochemistry, pharmacology and toxicology. This revision describes the different strategies used for drug discovery on Chagas disease treatment. The most classic strategies as the design of analogous, the systematic screening or that one based on the biological information, together the most recent methods based on cheminformatics, are presented.

Keywords: Chagas Disease; *T. cruzi*; QSAR; Cheminformatics; Virtual screening; Neural network; Docking.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito es transmitido a los huéspedes vertebrados por un insecto hematófago, el *Triatoma infestans*, conocido como vinchuca o chinche. La enfermedad de Chagas también puede transmitirse a través de transfusiones de sangre, de madres a hijos durante el embarazo, o con menos frecuencia, a través de trasplantes de órganos o alimentos contaminados. El parásito se reproduce en los tejidos internos y causa problemas en el corazón, el esófago, el colon y el sistema nervioso (1).

Esta enfermedad es una endemia parasitaria que afecta a unos 7,7 millones de personas en Latinoamérica, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile. No existe vacuna contra la enfermedad de Chagas y las personas afectadas pueden volverse a infectar después de recibir tratamiento farmacológico (2).

El hecho de que la enfermedad de Chagas esté íntimamente relacionada con la pobreza ha podido ser una de las razones que ha originado la falta de interés en el desarrollo de nuevos medicamentos eficaces. Esto explica que se sigan utilizando fármacos que fueron comercializados en los años 70, como el nifurtimox y el benznidazol que no están aprobados por la FDA (Federal Drug Administration). En la actualidad, esta enfermedad está clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad extremadamente olvidada (3).

El diseño de nuevos fármacos es una tarea compleja que requiere la colaboración interdisciplinar de muchos especialistas en diferentes campos de la ciencia. En el descubrimiento de nuevos fármacos hay que considerar, además de las propiedades farmacológicas, otros aspectos de gran relevancia, como es el de las propiedades ADMET (A: absorción, D: distribución, M: metabolismo, E: excreción y T: toxicidad). Por tanto, antes de tomar en consideración a un nuevo *cabeza de serie* (*lead compound*) de acuerdo a sus propiedades farmacológicas es necesario que se incluya un estudio más profundo de las propiedades ADMET del *hit*.

2. DISEÑO DE FÁRMACOS

El diseño de nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas puede abordarse mediante dos estrategias generales. La primera consiste en el aislamiento y estudio de productos naturales procedentes de la medicina tradicional o de otras fuentes y la segunda, se refiere al desarrollo de nuevos compuestos de síntesis química o de procedencia biotecnológica (4, 5).

El uso de productos naturales como estrategia en la búsqueda de nuevos *hits* para la enfermedad de Chagas se ha realizado fundamentalmente en productos naturales de origen vegetal, aunque también se han aislado algunos compuestos a partir de hongos o de especie marinas. Existen numerosas revisiones recientes que recogen los trabajos realizados en este campo (6-9). Únicamente citar algunas de las familias estudiadas y de las que se han encontrado moléculas activas como las leguminosas o fabáceas (*Cassia fistula*, *Harpalyce brasiliiana*, *Pterodon pubescens* (10), solanáceas (*Acnist arborescens*, *Physalis angulata*) boragináceas (*Cordia globosa*), clusiáceas (*Mammea americana*) (11) y diversas especies de la familia de las piperáceas (*Piper glabratum*, *P. acutifolium* (12); *P. gaudichaudianum*, *P. aduncum* (13); *P. crassinervium* (13, 14), *Peperomia blanda* (15).

A partir de estas especies naturales han sido aisladas y caracterizadas una gran variedad de estructuras químicas *con propiedades anti-T. cruzi* (8). De entre todas ellos podemos citar como más representativas a los flavonoides como chalconas, flavonas o isoflavonas; terpenoides como derivados de diterpenos

(icetexano, labdano, azorellano), triterpenos pentacíclicos o lactonas sesquiterpénicas; lignanos; cumarinas; catequinas; xantonas; arilfloroglucinoles; antraquinonas y naftilisoquinolinas (6-8) (Figura 1). Finalmente, mencionar que también se han obtenido derivados anti-T. cruzi aislados a partir de esponjas marinas (*Agelas sp.*) (16) y hongos (*Basidiomycota fungi*) (17).

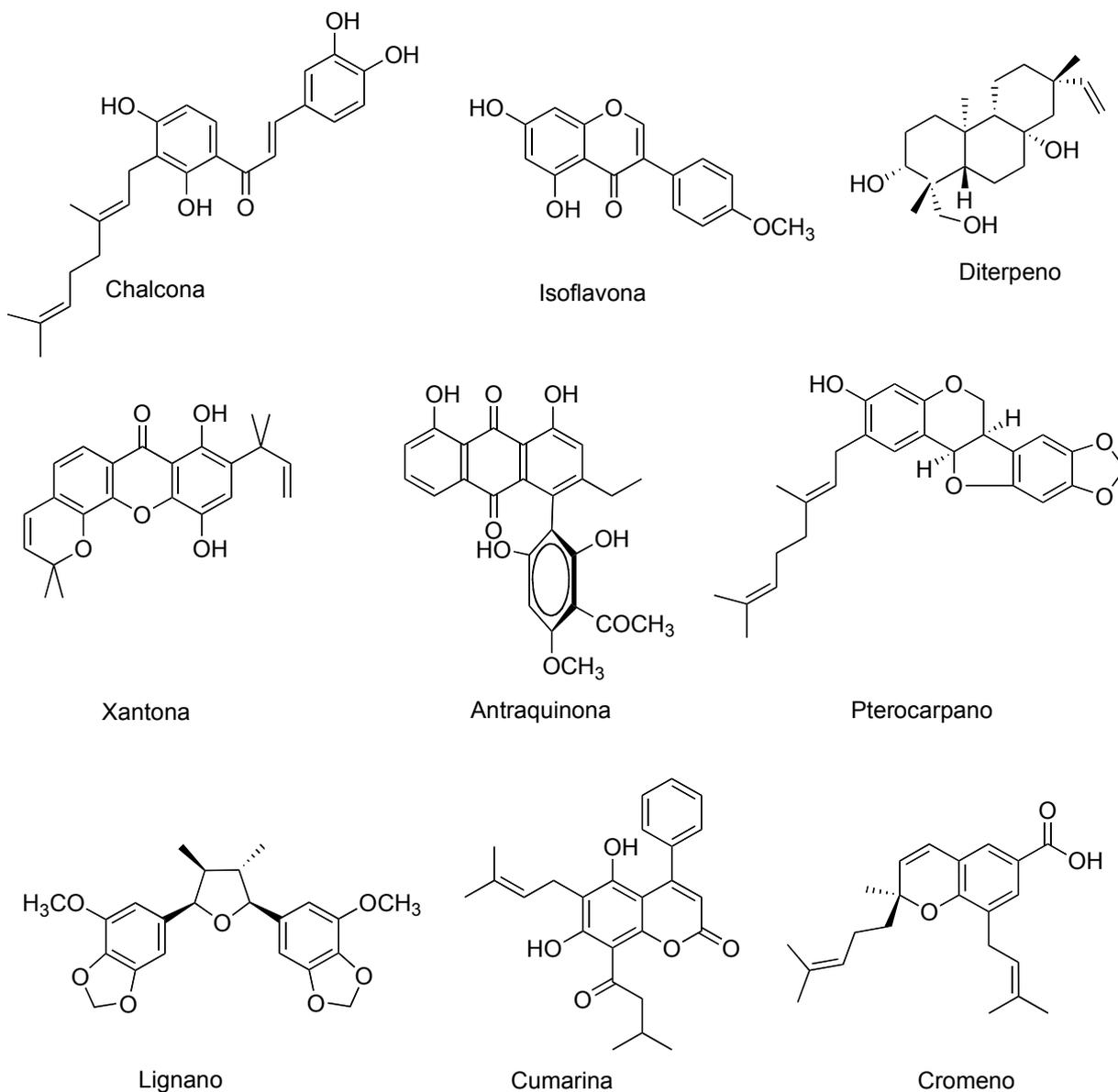


Figura 1.- Ejemplos representativos de productos naturales derivados de xantona (18), antraquinona (19), diterpeno (20), isoflavona (21) pterocarpano, chalcona (22), lignano (15), cumarina (11), cromeno (13).

Una estrategia más reciente utilizada en la búsqueda de nuevos *hits* es la que se refiere a la química combinatoria. Esta técnica fue desarrollada originalmente para la obtención de librerías con un número elevado de compuestos y para su posterior evaluación en diferentes dianas utilizando técnicas

de HTS (*high-throughput screening*; acrónimo inglés de cribado de alto rendimiento). La aproximación inicial de la realización del cribado de alto rendimiento a miles de compuestos tiene bastantes detractores y la tendencia actual es la obtención de librerías más pequeñas de compuestos bien caracterizados.

Una clasificación más sistemática para el diseño de fármacos, basada en la metodología utilizada, podría establecerse en cuatro grandes apartados: diseño de análogos, diseño basado en cribado (*screening*) sistemático, diseño basado en información biológica y quimioinformática (Figura 2).

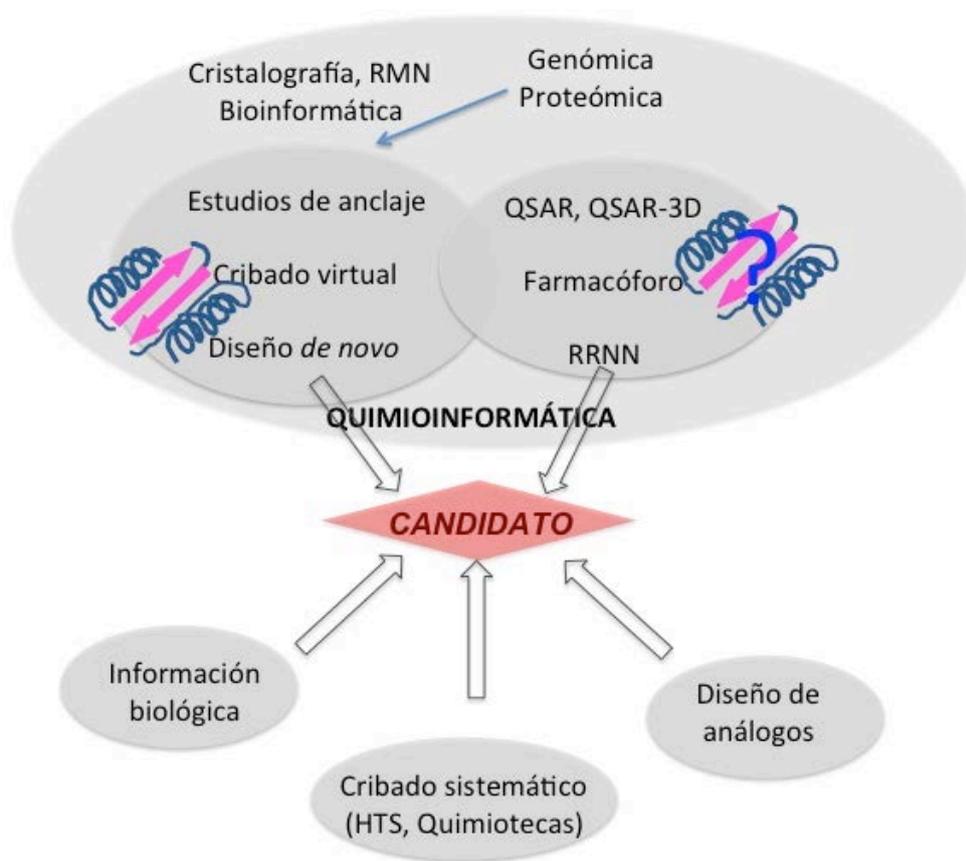


Figura 2.- Esquema general representativo en el diseño de fármacos.

2.1. Diseño de Análogos

Una de las estrategias más utilizadas para la obtención de derivados anti-*T. cruzi* ha sido el diseño de análogos de moléculas de probada actividad. Mediante esta estrategia moléculas con actividad biológica son modificadas para incrementar su potencia, su especificidad, mejorar su toxicidad, etc.

Desde el descubrimiento de la tripanosomiasis americana por Carlos Chagas en 1909 (23), un gran número de compuestos han sido sometidos a evaluación con el objetivo de encontrar moléculas que fueran activas frente al *Tripanosoma cruzi*. Entre las familias de derivados estudiadas se pueden citar derivados de fenotiazinas, acridinas, fenazinas, imidazoles, nitroimidazoles, triazoles, nitroimidazoles, tiadiazoles, isoxazoles, purinas, naftoquinonas, indoles, isoquinolinas, nitrofuranos, naftoquinonas, complejos metálicos etc. Las investigaciones realizadas utilizando métodos empíricos condujeron al descubrimiento de un nitrofurano (nifurtimox, Lampit) y un nitroimidazol (benznidazol; Rochagan), que son los dos compuestos heterocíclicos comercializados en 1972 y 1974, respectivamente (1). Ninguno de los dos está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration)(24) por lo que en Estados Unidos solo están disponibles a través de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (25).

Desde entonces, se han preparado cientos de análogos correspondientes a diferentes familias, algunas de los cuales han mostrado interesantes propiedades anti-*T. cruzi* (Figura 3). Se pueden citar derivados de 5-nitrofurilo, 5-nitrotienilo; furoxanilo, benzofuroxanilo (26, 27); quinoxalinilo, imidazolilo o benzimidazolilo, indazolilo, (28), imidazolidinas (29), imidazo[4,5-*c*][1,2,6]tiadiazinas (30), imidazo[1,2-*b*]isoquinolinas (31). Otras familias descritas con propiedades anti-*T. cruzi* corresponden a N-óxidos de furoxano o benzofuroxano, imidazol o benzimidazol, indazol o quinoxalina (32, 33).

2.2. Diseño Basado en Cribado Sistemático

Este método consiste en someter a las nuevas moléculas objeto de estudio, bien sean de procedencia sintética o de origen natural, a evaluación farmacológica utilizando cualquier prueba biológica, sin una hipótesis previa. Se basa en el uso sistemático de baterías de test en cualquier modelo experimental, si bien la tendencia actual es utilizar pruebas *in vitro*, ensayos de anclaje (*binding*), inhibición enzimática, órganos aislados, cultivos celulares, etc. El cribado puede hacerse ensayando un pequeño número de moléculas, químicamente sofisticadas y novedosas, a una serie de pruebas biológicas o llevarse a cabo al azar buscando un *hit* entre centenares de moléculas. Una estrategia frecuentemente utilizada es la de incluir *intermedios sintéticos*, ya que en general, en las rutas de síntesis utilizadas para la síntesis de los compuestos objetivo, es necesario la preparación previa de productos intermedios que guardan una cierta similitud estructural con los compuestos finales.

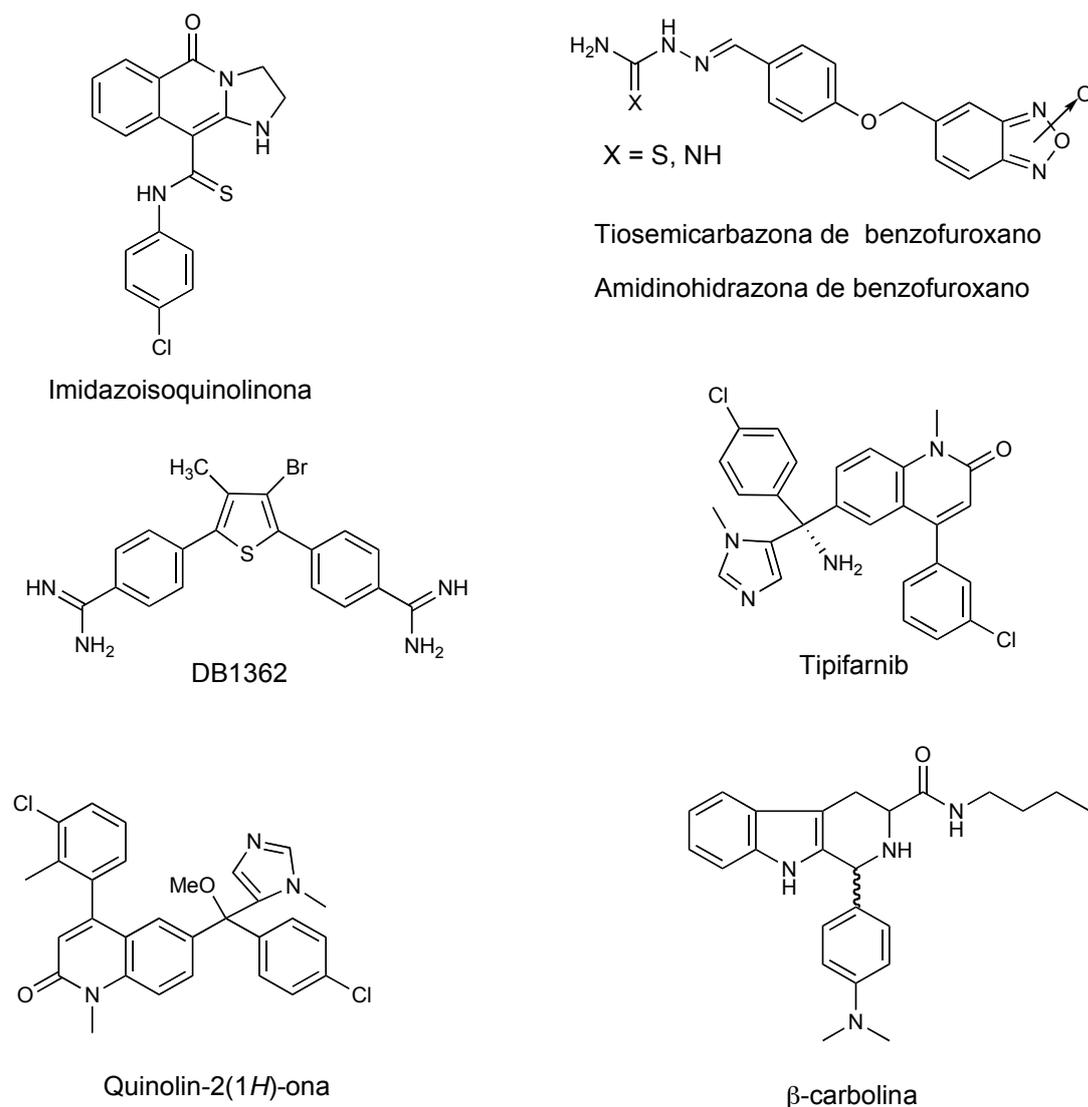


Figura 3.- Ejemplos representativos de derivados anti-*T. cruzi*.

Desde los años 80, con los avances de la robótica y de la miniaturización de los métodos de ensayos *in vitro*, en el HTS se han producido grandes avances con la introducción de estas mejoras. Este método se aplica utilizando técnicas de evaluación por desplazamiento de radioligandos o mediante procesos de inhibición enzimática. En la actualidad, la tendencia es sustituir los ensayos de radioligandos por ensayos de fluorescencia.

Las estrategias de *screening* que corresponden a métodos empíricos han sido las más utilizadas para el descubrimiento de nuevos prototipos en la búsqueda de compuestos anti- *T. cruzi*. Estas estrategias, aunque son aparentemente menos racionales, siguen siendo muy útiles para el descubrimiento de nuevos compuestos tripanomicidas, debido fundamentalmente al desarrollo y mejora de los ensayos *in vitro* en cepas de *Tripanosoma cruzi*.

El método de HTS que es ampliamente utilizado en la industria biofarmacéutica, ha sido poco aplicado en la búsqueda de nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas. Uno de los más interesantes corresponde a un trabajo en el que utilizando una biblioteca química de 2000 compuestos, se describen 3 nuevos derivados (Figura 4) que inhiben la replicación intracelular de amastigotes en el rango nM, con una baja toxicidad (34).

2.3. Diseño Basado en Información Biológica

Esta estrategia se basa en la observación de efectos biológicos en humanos, en animales, en vegetales o en microorganismos. La procedencia de estos datos puede proceder de fuentes muy diversas como: 1) estudio de medicinas indígenas; 2) observaciones clínicas de los efectos adversos o secundarios de medicinas; 3) nuevos usos para medicamentos ya utilizados para otras dolencias; 4) observaciones fortuitas de moléculas usadas en la industria.

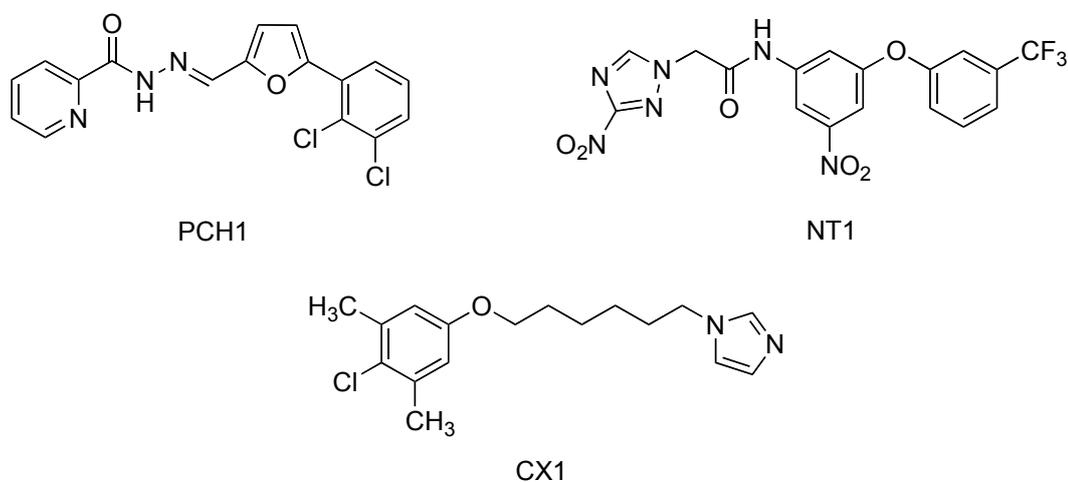


Figura 4.- Nuevos prototipos anti-*T. cruzi* descritos mediante un estudio HTS.

En este sentido, distintos principios activos han sido evaluados en este campo. Se pueden citar algunos que han sido estudiados sin buenos resultados, como los antibióticos, actinomicina D (35) o anfotericina B (36). Sin embargo, estudios en antifúngicos como el ketoconazol han demostrado efectividad en tejidos infectados en fase aguda, aunque con poca efectividad en fase crónica (37, 38). Mención aparte merece un análogo como el itraconazol (Figura 5), antifúngico perteneciente a la familia de los triazoles que está indicado en micosis superficiales y profundas. Este fármaco ejerce su efecto alterando la membrana celular del hongo mediante la inhibición de la síntesis del ergosterol interaccionando con la 14- α -desmetilasa, una enzima del citocromo P450 que es necesaria para la conversión del lanosterol a ergosterol. En el caso del itraconazol

los estudios realizados en adultos demostraron una curación parasitológica en el 20% de los enfermos estudiados, con un 50% de mejoría de las alteraciones electrocardiográficas (39). Otro caso interesante es el alopurinol (inhibidor de la biosíntesis de purinas) que si bien no es eficaz en el tratamiento de pacientes en fase aguda si presenta efecto en pacientes crónicos (Figura 5). Estudios comparativos con benznidazol y nifurtimox, mostraron menos efectos adversos en el grupo tratado con alopurinol (39). Estos compuestos si bien han mostrado utilidad en algunos de los casos estudiados (25, 39-41) deben de ser objeto de más investigaciones con protocolos más rigurosos en un mayor número de pacientes.

2.4. Quimioinformática

La quimioinformática combina los recursos de la información, para transformar datos en información e información en conocimiento, con el objetivo de encontrar nuevos *hits* o para la optimización de los mismos, de manera más científica y racional, con el consiguiente ahorro de tiempo y de recursos económicos (42). Las estrategias generales para el diseño racional de fármacos se pueden plantear dependiendo del conocimiento o desconocimiento de la estructura tridimensional del receptor o diana.

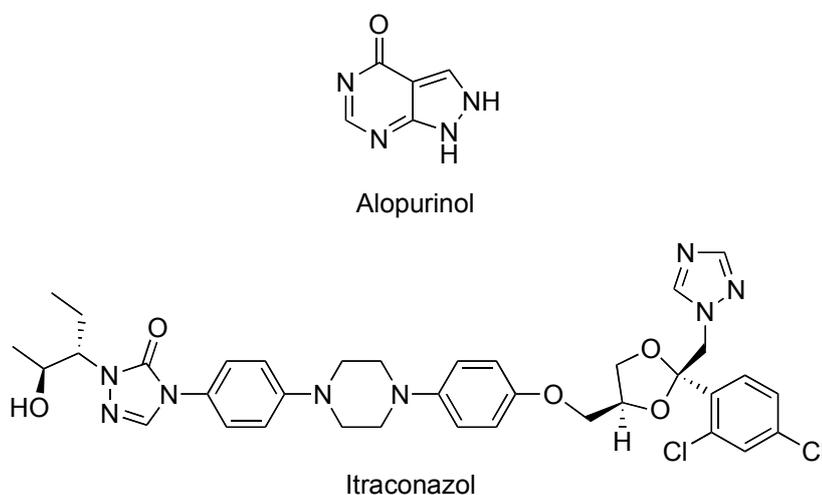


Figura 5.- Estructuras de medicamentos con actividad antichagásica.

2.4.1. Diseño basado en las moléculas bioactivas

Esta estrategia se basa en el estudio de moléculas cuyas propiedades farmacológicas han sido previamente demostradas y consiste en la búsqueda de elementos comunes, bien sean estructurales o relacionados con sus propiedades fisicoquímicas. Se pueden considerar diferentes modelos que se describen a continuación, dependiendo fundamentalmente de considerar propiedades 2D o 3D.

2.4.1.1. Modelo QSAR (relaciones estructura-actividad cuantitativa)

Para el establecimiento de un modelo QSAR, es necesario en primer lugar definir las moléculas mediante valores numéricos. Existen diferentes aproximaciones que se pueden considerar para la descripción de las estructuras bien sea mediante parámetros clásicos, definidos en función de criterios electrónicos, estéricos o hidrofóbicos o mediante descriptores que son calculados a partir de la representación de la estructura en dos o en tres dimensiones.

En general, los químicos representan las moléculas en dos dimensiones mediante un gráfico. Sin embargo, también pueden ser representadas por una serie de caracteres unidos y ordenados. Los más utilizados son el código SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) o el InChI (International Chemical Identifier).

La representación de la estructura tridimensional de una molécula es mucho más compleja, si bien tanto la geometría como las propiedades asociadas puede ser establecida mediante cálculos de mecánica molecular o de mecánica cuántica (43-45) (métodos DFT, *ab initio*, semiempíricos). La elección de uno u otro método depende fundamentalmente del tamaño de la molécula, de la naturaleza del problema planteado y del tiempo de cálculo requerido.

Otro aspecto importante es el método matemático usado en la búsqueda de modelos de predicción. El método MLR (Multiple Lineal Regression) (46, 47) que fue uno de los primeros en utilizarse a principios de los años noventa, permite encontrar relaciones lineales entre las propiedades observadas y un conjunto de descriptores. El principal problema radica en el hecho de que el número de moléculas usadas debe ser muy superior al número de descriptores empleados, y en que los descriptores o variables no independientes se traducen en modelos con una regresión de mala calidad. La regresión parcial por mínimos cuadrados o PLS (*Partial Least Square*) (47) soluciona en parte estos problemas, ya que es posible el uso de un número ilimitado de descriptores y soluciona el problema de la colinealidad entre variables.

Los modelos descritos en la bibliografía han sido utilizados para explicar la actividad en función de la estructura de series análogas o para el estudio de relaciones estructura actividad cuantitativa. En general, tienen más interés académico que utilidad para la búsqueda de nuevos prototipos estructuralmente diferentes. Los modelos publicados de estudios QSAR se han llevado a cabo con derivados de familias de semicarbazonas (48), imidazolininas (29), derivados heterocíclicos de *N*-óxido (32), 5-nitrofuril semicarbazonas (49), cumarinas (50), nitrofurazonas (51), etc utilizando la actividad anti-*T. cruzi*. En otros casos, la actividad antichagásica es representativa de un proceso enzimático como la inhibición de la Tripanotiona reductasa (51, 52) o de la *cruzipaína* (48, 53).

Estos modelos han utilizado diferentes tipos de descriptores que incluyen tanto parámetros clásicos, como otros obtenidos mediante química cuántica (29, 31, 54, 55). Las estrategias matemáticas más utilizados en el desarrollo de estos modelos corresponden a métodos de regresión lineal múltiple, si bien también han sido usados métodos no lineales (32, 48, 56). Un ejemplo que puede aplicarse para la predicción de nuevas moléculas (52), se refiere al desarrollo de un modelo cualitativo que mediante un análisis discriminante, permite diferenciar los compuestos activos/inactivos frente a la inhibición de la Tripanotona reductasa (IC_{50}) con un 90% y 89% de aciertos, en el conjunto de entrenamiento y validación, respectivamente. En el desarrollo del modelo se consideraron 1612 descriptores (geométricos y topológicos) y se estableció un modelo validado con 35 estructuras.

2.4.1.2. *Redes neuronales artificiales*

En el siglo XXI se ha incrementado la utilización de la inteligencia artificial, metodología basada en aproximaciones matemáticas no lineales. Este tipo de métodos consiguen simular procesos biológicos, ya sean cambios evolutivos o mutaciones en el caso de los algoritmos genéticos (57, 58) o el comportamiento de las redes neuronales biológicas en el caso de las RNA (redes neuronales artificiales) (59-62).

Una red neuronal artificial es un modelo de procesamiento de la información inspirado en el funcionamiento del sistema nervioso biológico y trata por tanto, de reproducir las características del cerebro humano. La estructura de este sistema de procesamiento se compone de un gran número de elementos interconectados (neuronas) que procesan la información recibida. El funcionamiento de una red neuronal depende de la arquitectura, del tipo de conexión entre las neuronas, y del mecanismo de aprendizaje (63) empleado en el proceso de entrenamiento.

Durante el proceso de aprendizaje la red neuronal puede modificar los pesos de las interconexiones en respuesta a los datos de entrada atendiendo a diferentes criterios (64). En el *aprendizaje supervisado* el proceso se realiza mediante un entrenamiento controlado por un agente externo (supervisor o maestro) que determina la respuesta que debería generar la red a partir de los datos de entrada. En el *aprendizaje no supervisado*, la red no requiere de la influencia externa para ajustar los pesos de las conexiones entre sus neuronas y por tanto, no recibe ninguna información por parte del entorno que le indique si la salida generada en respuesta a una entrada es o no correcta. Este tipo de redes son capaces de autoorganizarse, buscando las características, regularidades o patrones que se pueden establecer entre los datos de entrada.

Un ejemplo de aplicación de esta metodología ha sido realizada en 46 cetonas en las que se ha establecido un modelo de correlación con la constante de

inhibición de la cruzipáina mediante una red neuronal siguiendo el método de regulación Bayesiana (65).

Otra estrategia diferente basada en redes neuronales artificiales que permite la predicción de la actividad anti-T. *cruzi* de cualquier tipo de molécula ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo (66). Este procedimiento está basado íntegramente en la utilización de redes neuronales artificiales tanto en el proceso de definición de las moléculas como en el modelo de predicción. La metodología desarrollada para la obtención del modelo matemático, consiste en varias etapas (Figura 6).

Un conjunto representativo de 72 compuestos obtenidos de Cerecetto y col. (33) con diversidad tanto estructural como biológica fue seleccionado para el estudio. Teniendo en cuenta el porcentaje de la inhibición del crecimiento, la definición de las moléculas fue realizada mediante una red neuronal no supervisada utilizando el programa CODES® (67). CODES® genera descriptores topológicos de las estructuras mediante una red neuronal basada en un modelo de activación y competición interactiva (IAC) a partir de las estructuras graficas. CODES® parte de la representación gráfica de la molécula, generando el correspondiente espacio topológico que posteriormente es trasladado a un espacio neuronal (red neuronal isomorfa). Para cada molécula, CODES® genera un vector numérico con tantos elementos (descriptores) como átomos tenga la molécula. Puesto que el procesamiento de esta RNA es secuencial, para cada subproceso o iteración se generará un vector de actividad. El conjunto de todos estos vectores constituye una matriz dinámica, con tantas columnas como átomos tenga la molécula y cuyo último vector representa el estado de equilibrio del proceso.

La reducción de dimensiones de cada *matriz dinámica* (las estructuras quedan codificadas en cuatro descriptores) se realiza mediante una red neuronal de retropropagación del error y es necesaria para no perder la información de la matriz dinámica de CODES y para que el número de variables sea el mismo para todas las moléculas. Durante el entrenamiento de la red se estudian diferentes arquitecturas utilizando una red de retropropagación del error mediante un aprendizaje supervisado, ya que cada molécula de la serie de entrenamiento va asociada con su valor de actividad.

Siguiendo esta metodología se ha desarrollado una red neuronal (68) de arquitectura 4-4-1, a partir de 37 compuestos que presenta una capacidad de predicción del 78% en el test de validación externa (35 compuestos) (Figura 7).

Las ventajas más destacables de esta metodología son: a) se puede aplicar a conjuntos de moléculas químio- y biodiversas; b) no es necesario conocer la estructura tridimensional de los mínimos conformacionales; c) no es necesaria una

selección previa de parámetros para definir las moléculas; d) es aplicable a moléculas quirales.

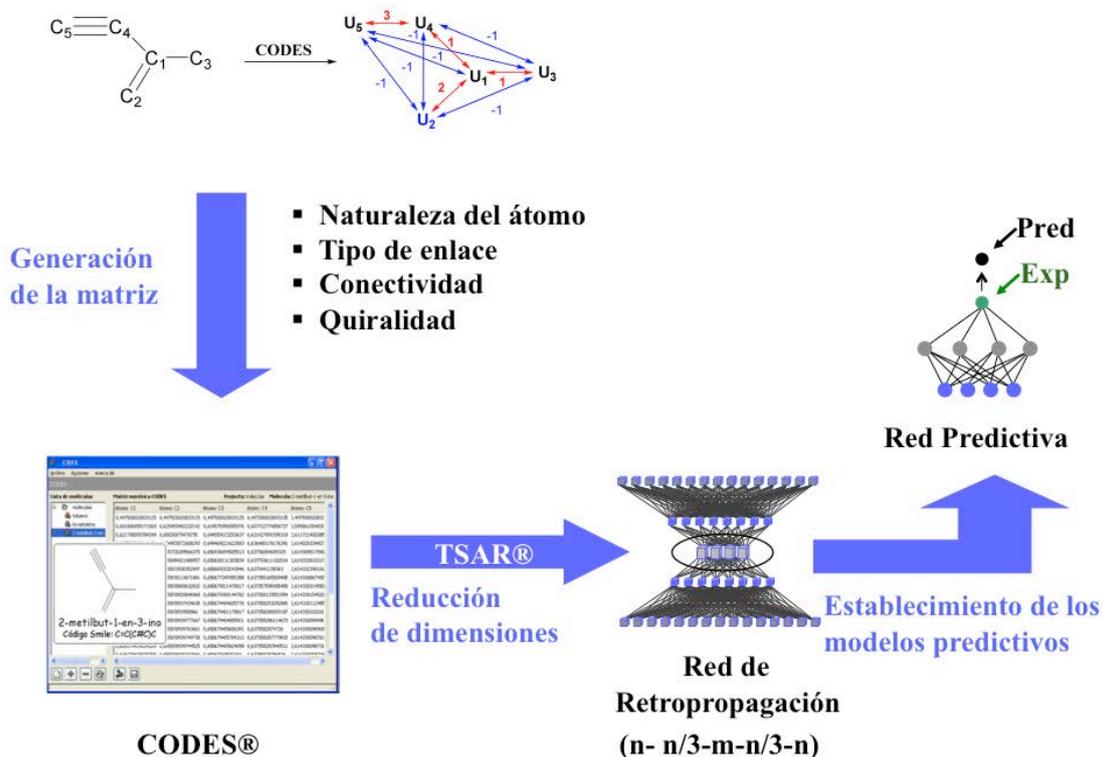


Figura 6.- Procedimiento para el establecimiento de una red neuronal para la predicción de la actividad antichagásica.

Esta metodología proporciona una herramienta de gran utilidad ya que la red final es capaz de estimar la inhibición del crecimiento parasitario de familias estructurales quimiodiversas de manera rápida y eficaz, lo que permite evitar costes innecesarios en el desarrollo de nuevos compuestos con potencialidad terapéutica.

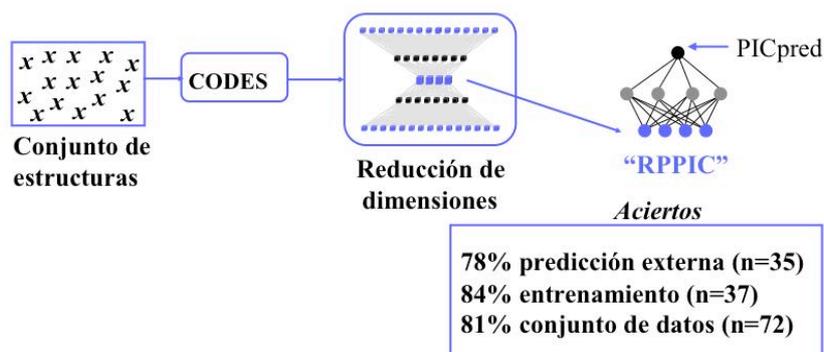


Figura 7.- Esquema de la red neuronal para la predicción de la actividad anti-*T. cruzi* (porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito, PIC).

2.4.1.3. Modelo de farmacóforo

Los requerimientos estéricos y electrónicos mínimos indispensables de una molécula para lograr la unión al receptor y originar una respuesta farmacológica es lo que constituye el concepto de farmacóforo (69) (Figura 8). Sin embargo, la presencia de un farmacóforo en cualquier estructura química no es condición suficiente para esperar una respuesta farmacológica.

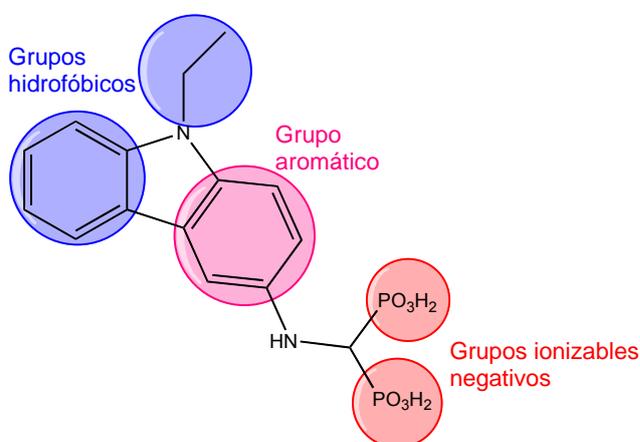


Figura 8.- Farmacóforo de los inhibidores de TcHx (adaptado de (70)).

El procedimiento seguido para el diseño de un farmacóforo comienza con la búsqueda de la conformación bioactiva, mediante técnicas de exploración del espacio conformacional. El segundo paso consiste en un proceso de superposición estructural de las moléculas consideradas. Y por último, el establecimiento de los requerimientos mínimos que tiene que cumplir una molécula para interactuar con la diana biológica propuesta. Este tipo de estudio necesita de un análisis conformacional riguroso de cada una de las moléculas a analizar, porque es posible que la conformación bioactiva del fármaco no sea la más estable termodinámicamente. Algunos de los programas más utilizados en la elucidación del farmacóforo son Catalyst (71), Galahad (72) y Gasp (73).

2.4.1.4. Modelo 3D-QSAR

El 3D-QSAR considera la naturaleza tridimensional de las moléculas, asumiendo que la interacción molécula-receptor puede ser representada por un conjunto de interacciones estéricas y electrostáticas, entre la molécula a estudiar y un "átomo sonda". Estas interacciones se conocen como MIP (*Molecular Interaction Potential*). Estadísticamente, no se trata de un modelo lineal como en el dimensional ya que vamos a tener una gran cantidad de variables, por tanto no se puede utilizar como herramienta estadística una regresión, sino que es necesario aplicar otras técnicas que permitan disminuir el número de variables (PLS).

Los métodos 3D-QSAR más utilizados son CoMFA (74, 75), CoMSIA (76, 77) y GRID/GOLPE (78). La principal diferencia entre estos métodos es el tipo de

descriptores que usan: los métodos CoMFA y CoMSIA calculan diferentes campos de interacción molecular, estéricos, electrostáticos, hidrofóbicos. El método GRID/GOLPE permite calcular un campo para cada sonda química implementada en el programa GRID, que utiliza aproximaciones de mecánica molecular.

Un ejemplo interesante de la aplicación de estas técnicas se puede encontrar en el diseño de inhibidores de la enzima hexoquinasa (HK) (70). La hexoquinasa es la primera enzima involucrada en la glicólisis de muchos organismos, entre los que se incluye el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi*.

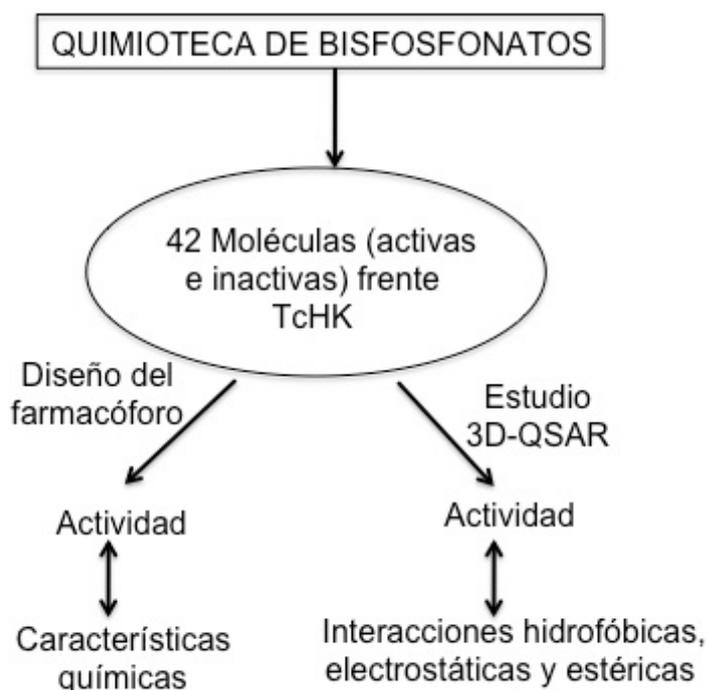


Figura 9.- Procedimiento empleado para el desarrollo de bisfosfonatos como inhibidores de la enzima hexoquinasa de *T. cruzi* (TcHK).

En base a estudios previos que mostraban que análogos de los bisfosfonatos eran potentes inhibidores de la hexoquinasa de *T. cruzi*, y haciendo uso de las herramientas antes comentadas como la construcción de un modelo de farmacóforo y estudios 3D-QSAR (CoMSIA) se ha explicado la actividad de los derivados de bisfosfonatos frente a la enzima hexoquinasa de *T. cruzi* y se han diseñado nuevos análogos (Figuras 9 y 10).

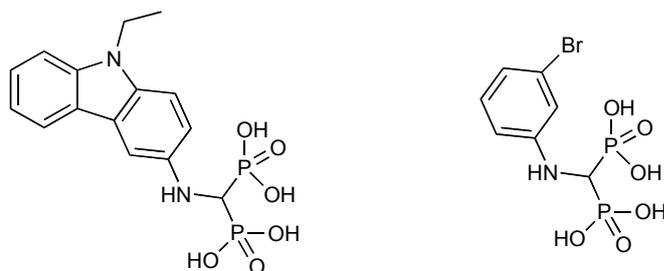


Figura 10.- Ejemplo de bisfosfonatos estudiados.

El modelo de farmacóforo construido con 17 compuestos activos considerando hasta un máximo de 256 conformaciones por cada compuesto, permitió confirmar la hipótesis de partida donde se presuponía que se necesitaban 2 grupos negativos ionizables, 2 grupos hidrofóbicos y un grupo aromático neutro (Figura 11).

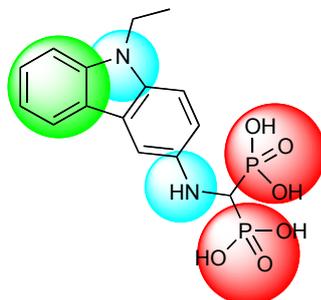


Figura 11.- Modelo de farmacóforo para la inhibición de TCHK.

El estudio 3D-QSAR se llevó a cabo con el programa CoMSIA, que calcula índices de similitud basándose en las interacciones (hidrofóbicas, electrostáticas y estéricas) entre una molécula y un átomo prueba, para posteriormente correlacionar dichos índices con la actividad. Los pasos seguidos en el estudio tridimensional se pueden resumir en los siguientes puntos: i) alineamiento del grupo de entrenamiento usando el patrón (H)O-PC-P-O(H); ii) cálculo de las interacciones de cada molécula del conjunto de entrenamiento con un átomo prueba (átomo sp^3 C); iii) análisis cuantitativo empleando PLS. Los resultados derivados del estudio 3D-QSAR (CoMSIA) pusieron de manifiesto que la contribución electrostática es más importante que la hidrofóbica o la estérica (43% frente al 24% y 13 % respectivamente) (Figura 12).

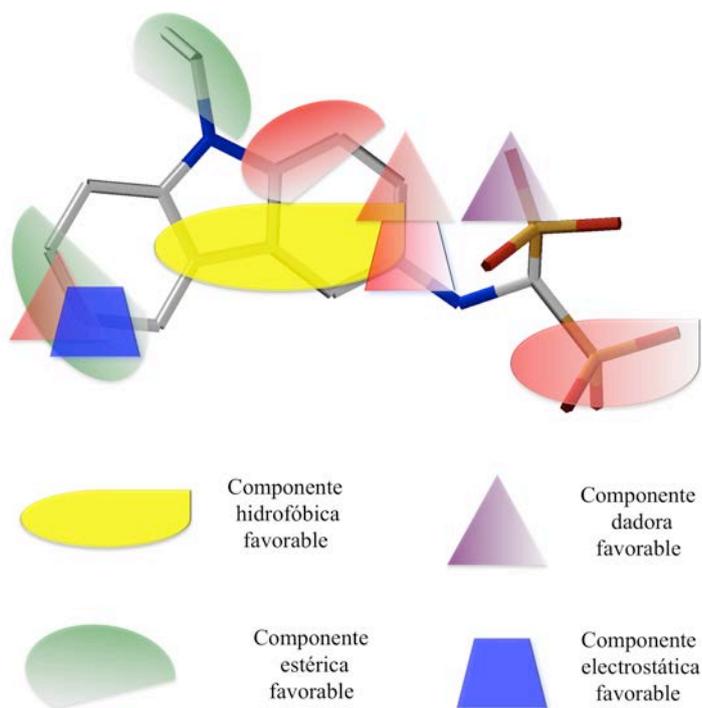


Figura 12.- Esquema de la contribución de las diferentes interacciones. El color rojo indica interacciones desfavorables.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede explicar por qué algunos bisfosfonatos que inhiben la enzima farnesil difosfato sintetasa (FPPS), no son inhibidores de la enzima TCHK. Para que un compuesto cumpla las condiciones en el modelo de farmacóforo de los inhibidores de FPPS es necesario una carga positiva, mientras que en el modelo de farmacóforo de los inhibidores de TCHK los puntos claves son grupos voluminosos y cadenas no cargadas (Figura 12).

2.4.2. Diseño basado en la estructura tridimensional de la diana. Estudio de las interacciones fármaco-receptor

Una gran variedad de procesos fisiológicos son la consecuencia de la interacción entre ligandos y macromoléculas. Conociendo la estructura de una determinada proteína es posible encontrar ligandos que puedan modificar la función de dicha proteína. Estas dianas pueden ser enzimas, receptores, canales de iones, proteínas de transporte o DNA. En general los fármacos que interactúan en estas dianas actúan mediante procesos de: inhibición enzimática, interferencia en la biosíntesis de la pared molecular, alteración del transporte en membranas celulares o mediante interacción con receptores de membrana o con receptores intracelulares.

La caracterización de la secuencia del genoma del *T. cruzi* que fue publicada en 2005 (79) y el correspondiente análisis proteómico, ha permitido la

identificación de características específicas de las diferentes etapas de su ciclo de vida (80). Desde entonces, el progreso en los conocimientos sobre su fisiología, bioquímica, nuevas rutas biosintéticas y las enzimas relevantes para la supervivencia del *T. cruzi* han sido muy relevantes y han proporcionado nuevas dianas para la exploración de nuevas estrategias para la quimioterapia en la enfermedad de Chagas.

Varias estructura terciarias obtenidas mediante cristalografía de rayos X de enzimas de *T. cruzi* han sido descritas y almacenadas en la base de datos de proteínas, PDB (*protein data bank*) (81). En la Tabla 1 se recogen las enzimas más representativas que podrían ser utilizadas en el diseño de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas.

Tabla 1.- Dianas representativas con estructura tridimensional.

Diana	Estructuras cristalográficas	Mecanismo de acción
Hipoxantina fosforibosil-transferasa (HGPRT)	1P17, 1P18, 1P19, 1I0I, 1I0L, 1I13, 1IL14, 1TC2, 1TC1	Captura de purinas y
Dihidrofolato reductasa-Timidilato sintetasa (DHFR-TS)	2H2Q, 3CL9, 3CLB	síntesis de nucleótidos
Cruzipaína	1AIM, 1EWL, 1EWM, 1EWO, 1EWP, 1F29, 1F2A, 1F2B, 1F2C, 1ME3, 1ME4, 1U9Q, 2AIM, 2EFM, 2OUL, 2OZ2	Responsable de la actividad proteolítica
Tripanotiona reductasa (TR)	1GXF, 1AOG, 1NDA	Síntesis y metabolismo del tripanotiona
Farnesil pirofosfato Sintetasa (FPPS)	3IBA, EICK, 3ICM, 3ICN, 3ICZ, 3ID0, 1YHK, 1YHL, 1YHM	Biosíntesis de ergosterol
Transialidasa	1MR5, 1MS0, 1MS1, 1MS3, 1MS4, 1MS5, 1MS8, 1MS9, 1S0I, 1S0J, 2AH2	Transferencia de residuos de ácido siálico
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	1K3T, 1ML3, 1QXS, 3DMT	Vía metabólica de oxidación de la glucosa
C14 α esterol demetilasa	2WUZ, 2WXZ	Biosíntesis de esteroides de membrana

2.4.2.2. Estudios de Anclaje

Los estudios de anclaje (*docking*) son una herramienta computacional muy útil para buscar la mejor unión entre dos moléculas, un receptor y un ligando, con el fin de diseñar ligandos más específicos que encajen con mayor precisión en el sitio de unión de la diana terapéutica (82-84).

En función de la información experimental de la que se disponga, la predicción de la unión proteína-ligando puede ser más o menos costosa. Si se dispone de complejos cristalizados ligando-receptor, el estudio del sitio de unión de nuevas moléculas resulta mucho más sencillo. Por otra parte, poder disponer de

datos biológicos experimentales como los obtenidos por mutagénesis dirigida, permiten deducir las interacciones entre el fármaco y la proteína. Con estas informaciones, se puede realizar un acoplamiento manual entre el ligando y el receptor mediante programas de modelización molecular para obtener así modelos que expliquen en lo posible los datos experimentales. Sin embargo, si no se dispone de datos experimentales (complejo 3D proteína-ligando cristalizado, estudios de mutagénesis, etc), existen métodos automáticos para explorar las posibles uniones entre ligando y receptor. Son los denominados programas de *docking*, los cuales realizan una exploración de todas las posibles posiciones relativas ligando-receptor evaluando la interacción intermolecular entre ambos mediante una función de *scoring* (85,86)

Los métodos más utilizados son: i) *fast shape matching* (DOCK(87), EUDOCK(88), LIGANDFIT(89)), ii) construcción incremental del ligando en la cavidad de la proteína (FLEXX(90)) y iii) algoritmos genéticos (FLEXIDOCK, GOLD(91), AUTODOCK3.0(92)),

Las aplicaciones de cribado virtual (93) permiten, a partir de grandes bases de datos de estructuras químicas (“quimiotecas” o *chemical libraries*), seleccionar aquellos compuestos que presentan una mayor afinidad por la diana terapéutica. En el cribado virtual se emplean diferentes filtros para ir reduciendo el número de estructuras. Estos filtros pueden realizarse empleando descriptores moleculares o definiendo un modelo de farmacóforo.. Se requiere poseer un archivo numeroso de ligandos potenciales, esto es, moléculas orgánicas con estructuras tridimensionales conocidas.

Una de las quimiotecas más utilizada es ZINC, que es una base de datos de libre distribución (94) cuyo catálogo completo ($2.8 \cdot 10^6$ moléculas) incluye moléculas de varias casas comerciales.

Un ejemplo interesante de la utilización de estos métodos se aplicó en el diseño de inhibidores de la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT)(98). El *Trypanosoma cruzi* es deficiente en la síntesis *de novo* de las purinas, por lo que deben obtener estos compuestos esenciales del hospedero. Una enzima esencial en este proceso es la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Diferentes estructuras tridimensionales de esta enzima (95-97) han sido resueltas mediante cristalografía de rayos X (Tabla 1). Gracias al conocimiento de estas estructuras junto con estudios de mutaciones se ha podido describir el sitio activo en el bucle I, definido por tres residuos análogos en la enzima humana, Leu67, Lys68 y Gly69. Mediante cribado virtual y usando la estructura cristalográfica de la HGPRT (Código PDB 1TC2) se identificaron 22 potenciales inhibidores, 16 de los cuales demostraron ser potentes inhibidores de la HGPRT y 3 de ellos efectivos agentes antiproliferativos *in vitro* contra la forma amastigote intracelular del parásito (Figura 13). El cribado virtual se realizó empleando un

programa de *docking* flexible (DOCK), enfrentando el sitio activo de la enzima HGPRT frente a la base de datos ACD (Available Chemicals Directory de MDL Information Systems, San Leandro, CA, USA).

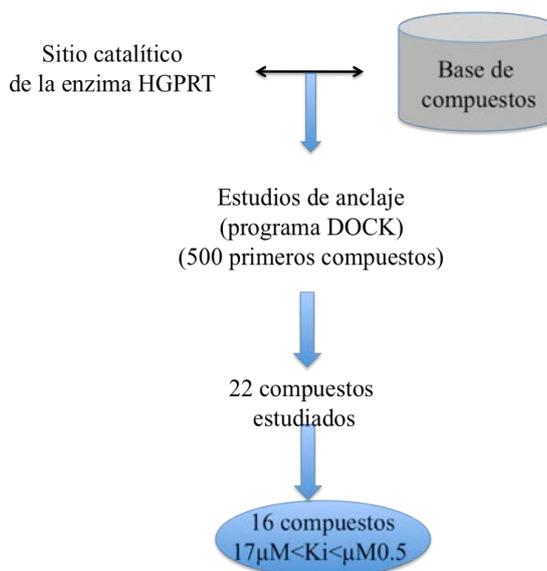


Figura 13.- Estrategia empleada en la identificación de nuevos inhibidores de HGPRT.

Otro ejemplo muy interesante de la aplicación de las técnicas de *docking* y cribado virtual al desarrollo de nuevos inhibidores de la enzima cruzipáina ha sido publicado recientemente (99).

La cruzipáina, una cisteín-proteasa, es responsable de la mayor parte de la actividad proteolítica de *T. cruzi* en todos los estadios de su ciclo de vida. Inhibidores selectivos de esta proteasa son capaces de bloquear la proliferación tanto de la forma extracelular (epimastigotes) como de los amastigotes intracelulares, así como de impedir la transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, lo que indica que la proteína tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del parásito. Ferreira y colaboradores (99) emplean de forma complementaria el cribado virtual (CV) y el cribado de alto rendimiento (HTS, high-throughput screening) de una quimioteca en busca de inhibidores reversibles y competitivos de la enzima cruzipáina (Figura 14).

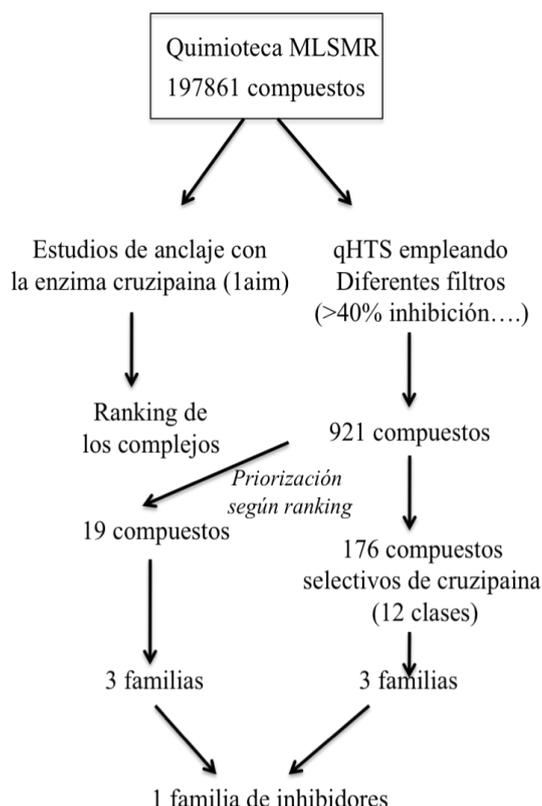


Figura 14.- Estrategia combinada de HTS y CV para el desarrollo de inhibidores competitivos de la enzima cruzipaina.

3. CONCLUSIONES

La singularidad de la enfermedad de Chagas, como enfermedad íntimamente relacionada con la pobreza y la ausencia de salubridad han sido, entre otros, factores fundamentales en el deficiente desarrollo de nuevos medicamentos. En la actualidad se siguen utilizando fármacos que fueron comercializados en los años 70, como el nifurtimox y el benznidazol que no están aprobados por la FDA. El hecho es que esta dolencia está considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad extremadamente olvidada.

La situación terapéutica en la enfermedad de Chagas no puede explicarse de ninguna manera, ni en función del estado actual del conocimiento de la enfermedad, ni de las herramientas disponibles para el diseño de fármacos, ya que son comparables con las existentes para cualquier otra enfermedad. Parece por tanto, que aunque el diseño racional es siempre útil y recomendable para que el descubrimiento de nuevos fármacos sea sostenible, se hace más indispensable, aún si cabe, para la búsqueda de nuevos medicamentos eficaces para la enfermedad de Chagas.

Es por tanto conveniente y deseable la utilización de todos los métodos disponibles independientemente que sean más o menos clásicos o que estén

basados en técnicas más novedosas como las relacionadas con la quimioinformática. En este sentido, la caracterización de la secuencia del genoma del *Trypanosoma cruzi* en 2005 y el correspondiente análisis proteómico, ha puesto al descubierto nuevas rutas biosintéticas y proteínas relevantes para la supervivencia del parásito y ha abierto nuevas líneas de investigación. En este sentido, en el desarrollo de nuevos fármacos aplicando métodos quimioinformáticos hay que resaltar entre otros, los que se refieren a los inhibidores de la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, de la cruzipaína y de la sintetasa de la farnesil-pirofosfato o hexoquinasa.

Con todos los recursos científicos disponibles, el descubrimiento de nuevos cabezas de serie (lead compound) y de nuevos fármacos debería de ser un proceso más rápido, económico, eficiente y sostenible.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto TRA2009_0085, 2010-2011), al CSIC (proyecto de cooperación 2009UY01) y a la red CYTED (<http://ridimedchag.fq.edu.uy>; RIDIMEDCHAG) la ayuda recibida.

5. REFERENCIAS

1. Sanchez-Sancho, F., Campillo, N. E., & Paez, J. A. (2010) Chagas disease: progress and new perspectives. *Curr Med Chem* 17(5), 423-452
2. Pan American Health Organization (PAHO: <http://www.paho.org>).
3. Global Plan To Combat Neglected Tropical Diseases 2008–2015. World Health Organization 2007.
4. Wermuth, C. G. (2008). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 edn. Elsevier Ltd.: Madrid.
5. Avendaño, C. (2001). *Introducción a la Química Farmacéutica*. Vol. 1, 2ª edn. Mc Graw Hill: Madrid.
6. Sepulveda-Boza, S., & Cassels, B. K. (1996). Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 62(2), 98-105.
7. Coura, J. R., & de Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1), 3-24.
8. Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., Ferreira, A., & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146(4), 601-620.
9. Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga Junior, V. F., & Nakamura, C. V. (2011). Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Rep* 28(4), 809-823.
10. Menna-Barreto, R. F., Laranja, G. A., Silva, M. C., Coelho, M. G., Paes, M. C., Oliveira, M. M., & de Castro, S. L. (2008). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res* 103(1), 111-117.

11. Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muniz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., & Hernandez-Ortega, S. (2008). Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(5), 431-436.
12. Flores, N., Jimenez, I. A., Gimenez, A., Ruiz, G., Gutierrez, D., Bourdy, G., & Bazzocchi, I. L. (2008). Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. *J Nat Prod* 71(9), 1538-1543.
13. Batista, J. M., Jr., Lopes, A. A., Ambrosio, D. L., Regasini, L. O., Kato, M. J., Bolzani Vda, S., Cicarelli, R. M., & Furlan, M. (2008). Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Biol Pharm Bull* 31(3), 538-540.
14. Lopes, A. A., Lopez, S. N., Regasini, L. O., Junior, J. M., Ambrosio, D. L., Kato, M. J., da Silva Bolzani, V., Cicarelli, R. M., & Furlan, M. (2008). In vitro activity of compounds isolated from Piper crassinervium against Trypanosoma cruzi. *Nat Prod Res* 22(12), 1040-1046.
15. Felipe, L. G., Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Bolzani Vda, S., Guimaraes, E. F., Cicarelli, R. M., & Furlan, M. (2008). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from Peperomia blanda. *Phytochemistry* 69(2), 445-450.
16. Vik, A., Proszenyak, A., Vermeersch, M., Cos, P., Maes, L., & Gundersen, L. L. (2009). Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; identification of hits for visceral leishmaniasis and Chagas disease. *Molecules* 14(1), 279-288.
17. Rosa, L. H., Machado, K. M., Rabello, A. L., Souza-Fagundes, E. M., Correa-Oliveira, R., Rosa, C. A., & Zani, C. L. (2009). Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95(3), 227-237.
18. Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jimenez-Estrada, M., & Reyes-Chilpa, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of Aristolochia taliscana. *Biol Pharm Bull* 25(9), 1188-1191.
19. Abegaz, B. M., Bezabih, M., Msuta, T., Brun, R., Menche, D., Muhlbacher, J., & Bringmann, G. (2002). Gaboroquinones A and B and 4'-O-demethylknipholone-4'-O-beta-D-glucopyranoside, phenylanthraquinones from the roots of Bulbine frutescens. *J Nat Prod* 65(8), 1117-1121.
20. Ambrosio, S. R., Arakawa, N. S., Esperandim, V. R., de Albuquerque, S., & Da Costa, F. B. (2008). Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from Viguiera arenaria (Asteraceae). *Phytother Res* 22(10), 1413-1415.
21. Sartorelli, P., Carvalho, C. S., Reimao, J. Q., Ferreira, M. J., & Tempone, A. G. (2009). Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of Cassia fistula (Leguminosae). *Parasitol Res* 104(2), 311-314.
22. Vieira, N. C., Espindola, L. S., Santana, J. M., Veras, M. L., Pessoa, O. D., Pinheiro, S. M., de Araujo, R. M., Lima, M. A., & Silveira, E. R. (2008). Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. *Bioorg Med Chem* 16(4), 1676-1682.
23. Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiose humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
24. Food and Drug Administration (FDA). <http://www.fda.gov>.
25. Center for Disease Control and Prevention. Division of Parasitic Diseases (DPD), Antiparasitic treatment of Chagas disease Available at. <http://www.cdc.gov/chagas/hcp/tx.html>.
26. Porcal, W., Hernandez, P., Boiani, L., Boiani, M., Ferreira, A., Chidichimo, A., Cazzulo, J. J., Olea-Azar, C., Gonzalez, M., & Cerecetto, H. (2008). New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorg Med Chem* 16(14), 6995-7004.

27. Rodriguez, J., Gerpe, A., Aguirre, G., Kemmerling, U., Piro, O. E., Aran, V. J., Maya, J. D., Oleazar, C., Gonzalez, M., & Cerecetto, H. (2009). Study of 5-nitroindazoles' anti-Trypanosoma cruzi mode of action: electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *Eur J Med Chem* 44(4), 1545-1553.
28. Boiani, L., Gerpe, A., Aran, V. J., Torres de Ortiz, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., Sanabria, L., Yaluff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Maya, J. D., Morello, J. A., Cerecetto, H., & Gonzalez, M. (2009). In vitro and in vivo antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles. *Eur J Med Chem* 44(3), 1034-1040.
29. Caterina, M. C., Perillo, I. A., Boiani, L., Pezaroglo, H., Cerecetto, H., Gonzalez, M., & Salerno, A. (2008). Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem* 16(5), 2226-2234.
30. Paéz, J. A., Campillo, N. E., Guerra, A., Gonzalez, M., & Cerecetto, H. Una Nueva Familia de Antichagásicos Derivados de 2,2-Dióxido de Imidazo[4,5-c][1,2,6]tiadiazina. Patente ESP 200900225; PCT1641-296. 2010 Ene 26.
31. Bollini, M., Casal, J. J., Alvarez, D. E., Boiani, L., Gonzalez, M., Cerecetto, H., & Bruno, A. M. (2009). New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem* 17(4), 1437-1444.
32. Boiani, M., Cerecetto, H., Gonzalez, M., & Gasteiger, J. (2008). Modeling anti-Trypanosoma cruzi activity of N-oxide containing heterocycles. *J Chem Inf Model* 48(1), 213-219.
33. Cerecetto, H., & Gonzalez, M. (2008). Anti-T. cruzi agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini Rev Med Chem* 8(13), 1355-1383.
34. Bettiol, E., Samanovic, M., Murkin, A. S., Raper, J., Buckner, F., & Rodriguez, A. (2009). Identification of Three Classes of Heteroaromatic Compounds with Activity against Intracellular Trypanosoma cruzi by Chemical Library Screening. *PLoS Negl Trop Dis* 3(2), e384.
35. da Cruz, M. Q., Brascher, H. M., Vargens, J. R., & Oliveira-Lima, A. (1991). Effect of actinomycin D on Trypanosoma cruzi. *Experientia* 47(1), 89-92.
36. Cruz, F. S., Marr, J. J., & Berens, R. L. (1980). Prevention of transfusion-induced Chagas' disease by amphotericin B. *Am J Trop Med Hyg* 29(5), 761-765.
37. McCabe, R. (1988). Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *J Infect Dis* 158(6), 1408-1409.
38. McCabe, R. E., Remington, J. S., & Araujo, F. G. (1984). Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of Trypanosoma cruzi and protection of mice against lethal infection with the organism. *J Infect Dis* 150(4), 594-601.
39. Apt, W., Heitmann, I., Jercic, I., Jofré, L., Muñoz, P., Noemí, I., San Martín, A. M., Sapunar, J., Torres, M., & Zulantay, I. (2008). [Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease]. *Rev Chilena Infectol* 25(5), 384-389, discussion 387.
40. Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Solari, A., Sanchez, G., Mundaca, K., Coronado, X., Rodriguez, J., Gil, L. C., & Osuna, A. (2005). Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 99(8), 733-741.
41. Zulantay, I., Apt, W., Rodriguez, J., Venegas, J., & Sanchez, G. (1998). [Serologic evaluation of treatment of chronic Chagas disease with allopurinol and itraconazole]. *Rev Med Chil* 126(3), 265-270.
42. Oprea, T., Mannhold, R., Kubinyi, H., & Folkers, G. (2006). *Chemoinformatics in Drug Discovery*. Wiley-VCH.
43. Koch, W., & Holthausen, M. C. (2001). *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. 3^a edn. Wiley-VCH Verlag GmbH.

44. Young, D. C. (2001). *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. 3^a edn. John Wiley & Sons, Inc.
45. Hehre, W. S., Radom, L., Schleyer, P. v. R., & Pople, J. A. (1986). *Ab initio Molecular Orbital Theory*. 3^a edn. John Wiley & Sons, Inc.
46. Freund, R., & Wilson, W. (1998). *Regression Analysis: Statistical Modeling of a Response Variable*. Academic Press.
47. Draper, N., & Smith, H. (1998). *Applied regression analysis*. Wiley New York.
48. Guido, R. V., Trossini, G. H., Castilho, M. S., Oliva, G., Ferreira, E. I., & Andricopulo, A. D. (2008). Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 23(6), 964-973.
49. Aguirre, G., Boiani, M., Cabrera, E., Cerecetto, H., Di Maio, R., Gonzalez, M., Denicola, A., Sant'anna, C. M., & Barreiro, E. J. (2006). New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA). studies. *Eur J Med Chem* 41(4), 457-466.
50. Menezes, I. R., Lopes, J. C., Montanari, C. A., Oliva, G., Pavao, F., Castilho, M. S., Vieira, P. C., & Pupo, M. T. (2003). 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. *J Comput Aided Mol Des* 17(5-6), 277-290.
51. Martinez-Merino, V., & Cerecetto, H. (2001). CoMFA-SIMCA model for antichagasic nitrofurazone derivatives. *Bioorg Med Chem* 9(4), 1025-1030.
52. Prieto, J. J., Talevi, A., & Bruno-Blanch, L. E. (2006). Application of linear discriminant analysis in the virtual screening of antichagasic drugs through trypanothione reductase inhibition. *Mol Divers* 10(3), 361-375.
53. Trossini, G. H., Guido, R. V., Oliva, G., Ferreira, E. I., & Andricopulo, A. D. (2009). Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. *J Mol Graph Model*.
54. Paulino, M., Alvareda, E. M., Denis, P. A., Barreiro, E. J., Sperandio da Silva, G. M., Dubin, M., Gastellu, C., Aguilera, S., & Tapia, O. (2008). Studies of trypanocidal (inhibitory). power of naphthoquinones: evaluation of quantum chemical molecular descriptors for structure-activity relationships. *Eur J Med Chem* 43(10), 2238-2246.
55. Vera-Divaio, M. A., Freitas, A. C., Castro, H. C., de Albuquerque, S., Cabral, L. M., Rodrigues, C. R., Albuquerque, M. G., Martins, R. C., Henriques, M. G., & Dias, L. R. (2009). Synthesis, antichagasic in vitro evaluation, cytotoxicity assays, molecular modeling and SAR/QSAR studies of a 2-phenyl-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-acrylic acid benzylidene-carbohydrazone series. *Bioorg Med Chem* 17(1), 295-302.
56. Freitas, R. F., Oprea, T. I., & Montanari, C. A. (2008). 2D QSAR and similarity studies on cruzain inhibitors aimed at improving selectivity over cathepsin L. *Bioorg Med Chem* 16(2), 838-853.
57. Rogers, D., & Hopfinger, A. (1994). Application of Genetic Function Approximation to Quantitative Structure-Activity Relationships and Quantitative Structure-Property Relationships. *J Chem Inf Model* 34(4), 854-866.
58. Devillers, J. (1996a). *Genetic Algorithms in Molecular Modeling*. Academic Press.
59. Livingstone, D. J., Manallack, D. T., & Tetko, I. V. (1997). Data modelling with neural networks: advantages and limitations. *J Comput Aided Mol Des* 11(2), 135-142.
60. Livingstone, D. J., & Manallack, D. T. (1993). Statistics using neural networks: chance effects. *J Med Chem* 36(9), 1295-1297.
61. Devillers, J. (1996b). *Neural Networks in QSAR and Drug Design (Principles of QSAR and Drug Design)*. 1st edn. Academic Press: Lyon.
62. Zupan, J., & Gasteiger, J. (1999). *Neural networks in chemistry and drug desing*. 2nd edn. WILEY-VCH: Weinheim.

63. Kaiser, M. (2007). Brain architecture: a design for natural computation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 365(1861), 3033-3045.
64. Ichikawa, H. (2003). Hierarchy neural networks as applied to pharmaceutical problems. *Adv Drug Deliv Rev* 55(9), 1119-1147.
65. Caballero, J., Tundidor-Camba, A., & Fernaández, M. (2007). Modeling of the Inhibition Constant (K_i) of Some Cruzain Ketone-Based Inhibitors Using 2D Spatial Autocorrelation Vectors and Data-Diverse Ensembles of Bayesian Regularized Genetic Neural Networks *QSAR & Comb Sci* 26(1), 27-40.
66. Paéz, J. A., Campillo, N. E., Guerra, A., Gonzalez, M., & Cerecetto, H. (2009). Procedimiento para la determinación de la actividad antichagásica de una molécula. Patente ESP P200900242.
67. M. Stud CODES©; v1.0 (revision 3). ed.
68. Paéz, J. A., Campillo, N. E., Guerra, A., Gonzalez, M., & Cerecetto, H. (2009). Procedimiento para la determinación de la actividad antichagásica de una molécula. ESP P200900242.
69. Leach, A. R., Gillet, V. J., Lewis, R. A., & Taylor, R. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. *J Med Chem* 53(2), 539-558.
70. Hudock, M. P., Sanz-Rodriguez, C. E., Song, Y., Chan, J. M., Zhang, Y., Odeh, S., Kosztowski, T., Leon-Rossell, A., Concepcion, J. L., Yardley, V., Croft, S. L., Urbina, J. A., & Oldfield, E. (2006). Inhibition of Trypanosoma cruzi hexokinase by bisphosphonates. *J Med Chem* 49(1), 215-223.
71. Barnum, D., Greene, J., Smellie, A., & Sprague, P. (1996). Identification of common functional configurations among molecules. *J Chem Inf Comput Sci* 36(3), 563-571.
72. Richmond, N. J., Abrams, C. A., Wolohan, P. R., Abrahamian, E., Willett, P., & Clark, R. D. (2006). GALAHAD: 1. pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. *J Comput Aided Mol Des* 20(9), 567-587.
73. Jones, G., Willett, P., & Glen, R. C. (1995). A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J Comput Aided Mol Des* 9(6), 532-549.
74. Cramer, R. D., Patterson, D. E., & Bunce, J. D. (1988). Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc* 110: 5959-5967.
75. Cramer, R. D., Patterson, D. E., & Bunce, J. D. (1989). Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA). *Prog Clin Biol Res* 291: 161-165.
76. Klebe, G., & Abraham, U. (1999). Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA). to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J Comput Aided Mol Des* 13(1), 1-10.
77. Klebe, G., Abraham, U., & Mietzner, T. (1994). Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA). of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem* 37(24), 4130-4146.
78. Nilsson, J., Wikstrom, H., Smilde, A., Glase, S., Pugsley, T., Cruciani, G., Pastor, M., & Clementi, S. (1997). GRID/GOLPE 3D quantitative structure-activity relationship study on a set of benzamides and naphthamides, with affinity for the dopamine D3 receptor subtype. *J Med Chem* 40(6), 833-840.
79. El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasca, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osogawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O.,

- Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., & Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733), 409-415.
80. Atwood, J. A., 3rd, Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309(5733), 473-476.
81. Protein Data Bank. <http://www.pdb.org>.
82. De Azevedo, W. F., Jr., & Dias, R. (2008). Computational methods for calculation of ligand-binding affinity. *Curr Drug Targets* 9(12), 1031-1039.
83. Dias, R., & de Azevedo, W. F., Jr. (2008). Molecular docking algorithms. *Curr Drug Targets* 9(12), 1040-1047.
84. Congreve, M., Chessari, G., Tisi, D., & Woodhead, A. J. (2008). Recent developments in fragment-based drug discovery. *J Med Chem* 51(13), 3661-3680.
85. Huang, S.Y., Grinter, S.Z. Zou, X. (2011). Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 12899-12908.
86. Zhong, S., Zhang, Y., Xin, Z. (2011) Rescoring ligand docking poses. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 13, 326-334.
87. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* 161(2), 269-288.
88. Perola, E., Xu, K., Kollmeyer, T. M., Kaufmann, S. H., Prendergast, F. G., & Pang, Y. P. (2000). Successful virtual screening of a chemical database for farnesyltransferase inhibitor leads. *J Med Chem* 43(3), 401-408.
89. Venkatachalam, C. M., Jiang, X., Oldfield, T., & Waldman, M. (2003). LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J Mol Graph Model* 21(4), 289-307.
90. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* 261(3), 470-489.
91. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267(3), 727-748.
92. Morris, G. M. G., D.S.; Halliday, R.S., Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19(14).
93. Kontoyianni, M., Madhav, P., Suchanek, E., & Seibel, W. (2008). Theoretical and practical considerations in virtual screening: a beaten field? *Curr Med Chem* 15(2), 107-116.
94. ZINC. <http://blaster.docking.org/zinc>.
95. Canyuk, B., Medrano, F. J., Wenck, M. A., Focia, P. J., Eakin, A. E., & Craig, S. P., 3rd (2004). Interactions at the dimer interface influence the relative efficiencies for purine nucleotide synthesis and pyrophosphorolysis in a phosphoribosyltransferase. *J Mol Biol* 335(4), 905-921.
96. Canyuk, B., Focia, P. J., & Eakin, A. E. (2001). The role for an invariant aspartic acid in hypoxanthine phosphoribosyltransferases is examined using saturation mutagenesis, functional analysis, and X-ray crystallography. *Biochemistry* 40(9), 2754-2765.
97. Focia, P. J., Craig, S. P., 3rd, Nieves-Alicea, R., Fletterick, R. J., & Eakin, A. E. (1998). A 1.4 Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* 37(43), 15066-15075.

98. Freymann, D. M., Wenck, M. A., Engel, J. C., Feng, J., Focia, P. J., Eakin, A. E., & Craig, S. P. (2000). Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chem Biol* 7(12), 957-968.
99. Ferreira, R. S., Simeonov, A., Jadhav, A., Eidam, O., Mott, B. T., Keiser, M. J., McKerrow, J. H., Maloney, D. J., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2010). Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *J Med Chem* 53(13), 4891-4905.

Avizores del Sistema Inmune, Guardianes del Organismo

Francisco Sánchez Madrid^{1,2*}, Pilar Martín²

¹Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa. Universidad Autónoma de Madrid.

²Dpto. Biología Vascular e Inflamación. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.

Recibido el 5 de diciembre de 2011.

e-mail: fsanchez.hipr@salud.madrid.org

RESUMEN

La respuesta inmune comienza cuando nuestro cuerpo entra en contacto con sustancias extrañas (antígenos), por ejemplo patógenos tales como bacterias o virus. Las células implicadas en la iniciación de la respuesta (células dendríticas y macrófagos tisulares) están situadas estratégicamente en los sitios de concentración de antígeno, donde son activadas localmente. El reconocimiento de los patógenos es mediado por un conjunto de receptores de diferentes familias de moléculas tales como los de tipo Toll (TLRs), tipo Nod (NLRs), tipo RIG o lectinas tipo C. Estas células emigran a los órganos linfoides, como los ganglios linfáticos, donde alertan y activan a otras células que inician una reacción en cadena para eliminar el patógeno. Estos procesos incluyen el “recuerdo” del antígeno a través de la generación de linfocitos de memoria, que perpetúan el recuerdo del antígeno que los activó inicialmente y esperan una recurrencia del ataque. Estas células de memoria pueden actuar mucho más eficazmente, previniendo la posible re-infección. El fenómeno de la memoria inmunológica es la base de los procesos de inmunización y de las vacunas.

Palabras clave: Respuesta inmune innata; Células dendríticas; Receptores tipo Toll; Sinapsis inmune; Vacunas.

ABSTRACT

Immune system sentinels, guardians of the body

The immune response begins when our body comes in contact with foreign substances (antigens), for example pathogens such as bacteria or viruses. The cells involved in the initiation of the response (dendritic cells and tissue macrophages) are strategically placed at sites of antigen concentration where they are locally activated. Recognition of pathogens by these cells is mediated by a plethora of receptors from different molecular families, such as Toll-like (TLRs), NLRs, RIG-like and C-lectin receptors. These cells migrate to lymphoid organs such as lymph nodes,

where they alert and activate other cells initiating a cascade of processes to eliminate the pathogen. These processes include the generation of “memory lymphocytes”, which perpetuate the memory of the antigen initially recognized and wait for a recurrence of the attack. These memory cells are able to act much more effectively, preventing possible re-infection. The phenomenon of immunological memory is the base of the processes of immunization and vaccines.

Keywords: Innate immune response; Dendritic cells; Toll-like receptors; Immune synapse; Vaccines.

1. INTRODUCCIÓN: RESPUESTA INMUNE INNATA

Los linfocitos poseen componentes moleculares de reconocimiento de antígenos extraordinariamente complejos y sofisticados: el receptor de antígeno de los linfocitos T y los anticuerpos de los linfocitos B. Este mecanismo hace posible que nuestro organismo se defienda de forma específica de determinados patógenos con los que ha entrado en contacto con anterioridad. Esto es lo que denominamos la inmunidad adaptativa. Otros componentes, de menor complejidad y diversidad, pero dotados de una gran eficiencia, conforman la llamada inmunidad innata o natural. La inmunidad innata tiene como primer objetivo ser la línea de contención inmediata frente a una infección, controlando y eliminando los agentes patógenos. Su segundo objetivo consiste en advertir y activar a la respuesta inmune adaptativa.

Entre las propiedades de la respuesta inmune innata se incluyen la actuación inmediata, que no requiere una sensibilización previa, y su amplia especificidad frente a sustancias ajenas al organismo que se lleva a cabo gracias al reconocimiento de patrones moleculares microbianos (PAMPs), que tienen en común determinados grupos de microorganismos. De esta forma, la respuesta innata contiene solo un número limitado de receptores para PAMPs (del orden de 10³). Este aspecto contrasta con la respuesta inmune adaptativa, que reconoce detalles estructurales de componentes tanto microbianos como no microbianos, siendo la potencialidad de su repertorio de reconocimiento mucho mayor (del orden de 10⁹).

El grupo del Prof. C. Janeway, postuló que las estructuras y patrones microbianos que pueden ser reconocidas por la inmunidad innata, además de desempeñar un papel crítico en la inducción de la respuesta adaptativa posterior, deben cumplir las siguientes propiedades: i) estar ausentes en el organismo huésped; ii) estar conservadas en un gran número de microorganismos, de modo que puedan ser reconocidas por un número limitado de receptores; y iii) ser componentes esenciales de los microorganismos para así evitar su posible evasión del sistema inmune mediante mutación (1). Ejemplos de estos patrones

microbianos son: el lipopolisacárido de la membrana exterior de las bacterias gram-negativas, los peptidoglicanos, los lipopéptidos, las secuencias CpG no metiladas de ADN bacteriano o el ARN vírico de doble cadena (Figura 1). Curiosamente, se conocía con anterioridad que todos esos tipos de moléculas eran capaces de inducir la cascada de señalización que conduce a la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y así como de la respuesta inflamatoria. En ausencia del conocimiento detallado de los receptores para dichas estructuras microbianas, también se enunciaron hipótesis alternativas, donde se sustituyen las estructuras microbianas extrañas al organismo, por las señales de peligro que pueden surgir tanto del exterior como del interior celular (2).

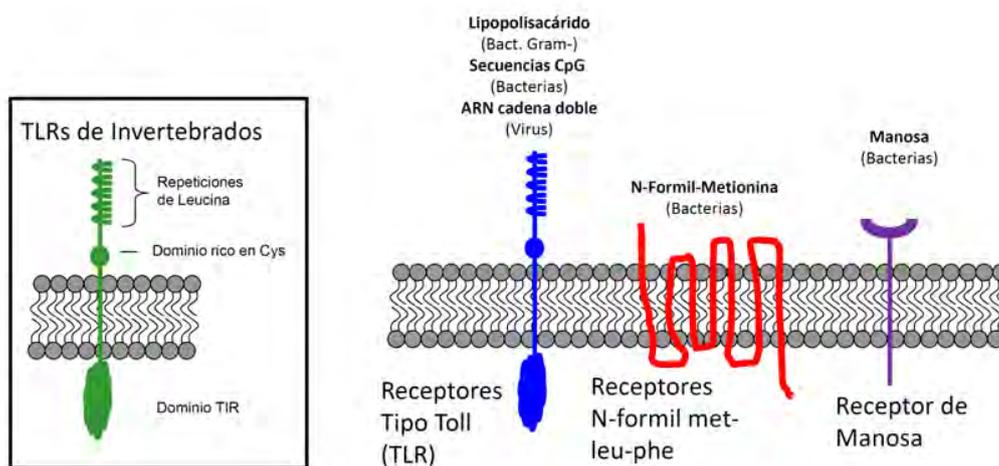


Figura 1.- Reconocimiento de patrones asociados a microorganismos patógenos (PAMPs). Tipos de PAMPs y sus receptores. En el recuadro se ilustra el esquema de la estructura de un receptor tipo Toll. Se representan los receptores para PAMPs, así como sus ligandos.

Las células que componen el sistema inmune innato, son esencialmente los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) y las células dendríticas (DCs) (Figura 2). Además, forman parte de la respuesta innata, las células citotóxicas naturales, o NK, y el sistema de complemento, que se ocupan de reconocer células dañadas o infectadas y eliminarlas.

Debido al hecho de que algunos de estos tipos celulares poseen un sistema de receptores que reconoce patrones moleculares invariables, comunes para muchos microbios, su activación es considerablemente más rápida que la observada en la respuesta adaptativa. Esto las convierte en la primera barrera de la respuesta inmune, que permite el inicio de la respuesta inmunitaria. Aún así, la comunicación entre los dos tipos de inmunidad, innata y adaptativa, es necesaria

para una respuesta inmune completa. El eslabón entre ambas ramas lo constituyen, precisamente, las DCs.

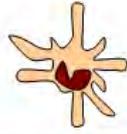
	Neutrófilos 	Monocitos y Macrófagos 	Células Dendríticas 
Origen y Localización	Origen en Médula Ósea Pasan a sangre Migran a tejidos	Origen en Médula Ósea Pasan a sangre (Mo) Migran a tejidos (Mφ)	Origen en Médula Ósea En tejidos y mucosas Migran a ganglios
Receptores para Microorganismos	Receptores de complemento Receptores de anticuerpos	Receptores de complemento Receptores de anticuerpos Receptores de PAMPs	Receptores de complemento Receptores de anticuerpos Receptores de PAMPs
Funciones	Son rápidamente reclutados al foco inflamatorio. Fagocitosis	Son reclutados al foco inflamatorio. Fagocitosis Activan la respuesta inflamatoria y presenta antígeno	Captan antígeno Presentan antígeno

Figura 2.- Células principales del sistema inmune innato con capacidad de captura de patógenos.

El Nobel de Fisiología y Medicina 2011 premia tanto las investigaciones que asentaron las bases del reconocimiento de patógenos por parte del sistema inmune innato como el descubrimiento de las células dendríticas y su papel en la inmunidad adquirida. Los Profesores Jules Hoffman (Instituto de Biología Celular y Molecular, Universidad Estrasburgo, Francia), y Bruce A Beutler (Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, CA) han sido galardonados por el descubrimiento de los sensores moleculares de las células del sistema inmune innato (macrófagos y células dendríticas), con los que detectan a los microbios patógenos, así como la ruta de activación intracelular que desencadena la respuesta inflamatoria. El Prof. Ralph M Steinman (Universidad Rockefeller, New York) comparte con ellos el Premio por su descubrimiento de las células dendríticas y por las investigaciones posteriores, de enorme trascendencia en medicina, que sitúan a este tipo celular como nexo entre las dos ramas de la respuesta inmune.

2. EL DESCUBRIMIENTO DEL SISTEMA DE RECONOCIMIENTO DE LOS TLRs (TOLL Y LOS TOLL-LIKE RECEPTORS)

La inmunidad innata, primera línea de defensa, opera tanto en animales invertebrados como vertebrados para contener agentes infecciosos, hallándose conservados los sensores para patógenos en ellos. Los estudios del grupo de Prof. J

Hoffman en la mosca *Drosophila melanogaster*, parten de los estudios de la Dra C. Nusslein-Volhard, al comienzo de la década de los 80, sobre genes implicados en el desarrollo de la mosca, que organizan su simetría y polaridad, entre los que identificó el gen Toll (del alemán: Súper, Fantástico), que controla el establecimiento de su eje dorso-ventral (3).

Siguiendo la estela del trabajo del Prof. H Boman, que identificó en la hemolinfa del insecto una serie de potentes péptidos catiónicos antimicrobianos (4), el grupo del Dr. Hoffman identificó una nueva función para el gen Toll; la defensa de invertebrados frente a infecciones fúngicas (5). Concretamente, mediante el estudio de la regulación del péptido anti-fúngico drosomicina, observó que los mutantes en el gen Toll no eran capaces de expresar la drosomicina, y por tanto, eran muy susceptibles a las infecciones por el hongo *Aspergillus fumigatus*. Otro hallazgo de gran interés del grupo del Prof. Hoffman consistió en la identificación de motivos estructurales para NF- κ B en la drosomicina (6). Conjuntamente con el grupo del Dr. Charles Janeway propusieron así la existencia de mecanismos y receptores conservados evolutivamente en invertebrados y mamíferos, responsables del control de la respuesta inmune innata (7, 8). Poco después, se revelaría la homología de las regiones citoplásmicas del receptor de IL-1 con la proteína Toll (9).

De forma independiente, el grupo del Dr. Beutler, mediante el análisis del proceso molecular de la sepsis durante la respuesta a infecciones por bacterias gram-negativas en ratones, descubrió el gen responsable de su reconocimiento por parte de los macrófagos. El receptor codificado por dicho gen, denominado TLR4 (Toll-like receptor, "receptor parecido a Toll"), por su gran homología con el gen Toll de *Drosophila*, reconoce el lipopolisacárido o endotoxina, componente patogénico de las bacterias. Simultáneamente, Beutler y otros describieron la serie de procesos intracelulares que se desencadena después de la activación de este receptor TLR4, que culmina en la producción de proteínas y citocinas pro-inflamatorias, como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF-alfa). Desde entonces se consideraría a éste como indicador paradigmático de la inducción de la respuesta inflamatoria (10, 11).

3. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y LIGANDOS DE LOS TLRs

Gracias a estos primeros estudios, se conocen actualmente al menos 11 genes TLRs, implicados en la defensa frente a agentes bacterianos, fúngicos y víricos (Figura 3). Se pueden agrupar en dos categorías, dependiendo de si su expresión es en la membrana plasmática o bien en compartimentos endosomales. Entre los TLRs expuestos en membrana celular, están TLR2, que puede asociarse a TLR1 o TLR6 para reconocer lipopéptidos di- o tri-acilados; TLR5 y TLR11, que detectan respectivamente las proteínas bacterianas flagelina, un componente

esencial de la estructura del flagelo, o profilina del protozoo *Toxoplasma*. TLR4 a su vez, se encuentra en la membrana formando un complejo ternario con CD14, una molécula anclada por un enlace GPI, y la proteína de unión a lípidos MD2. La formación del complejo es necesaria para la transmisión de la señal intracelular (12). Los TLRs endosomales comprenden a TLR3, que reconoce ADN viral de doble cadena, TLR7 y 8, que reconocen ADN de cadena simple, y TLR9 para secuencias CpG no metiladas en ADN bacterianos (Figura 3). Estos TLRs son importantes como sistema sensor de infecciones intracelulares tanto víricas como bacterianas.

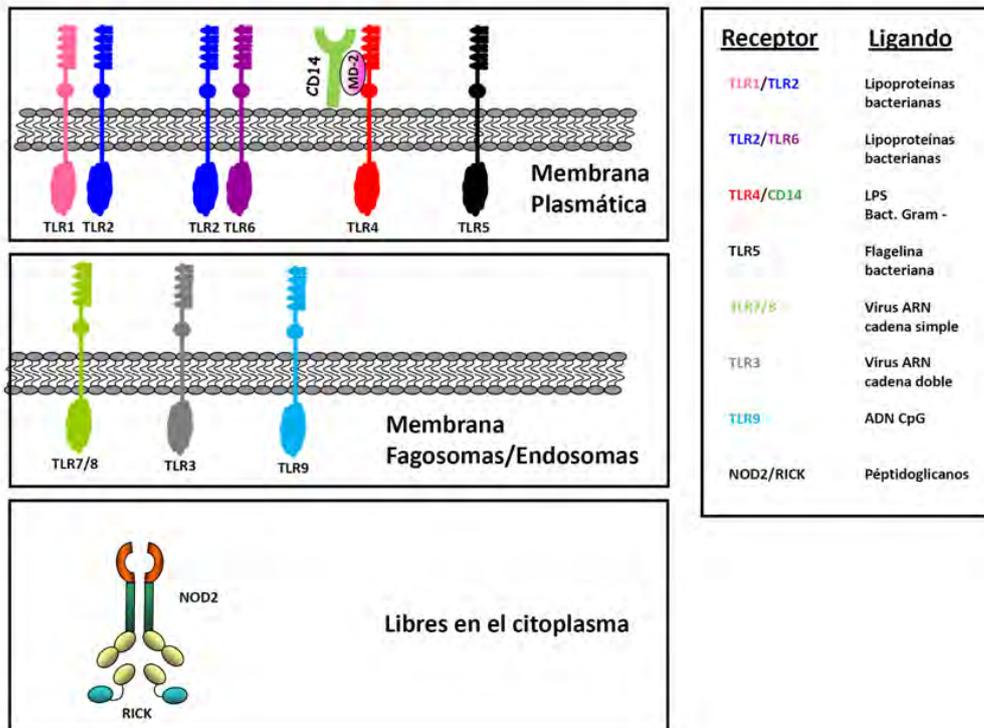


Figura 3.- Receptores TLRs de membrana plasmática e intracelulares.

Aún no se conocen los detalles precisos de cómo los TLRs pueden unir un abanico de ligandos estructuralmente tan diferentes como los ácidos nucleicos, y los lípidos. Los TLRs son proteínas integrales de membrana tipo I, que poseen secuencias repetidas ricas en leucina en sus regiones extracelulares y una corta secuencia de cisteínas. Los análisis estructurales de la interacción de algunos TLRs con sus ligandos a través de sus dominios de leucina (estructura en “herradura”) han revelado una gran versatilidad y flexibilidad para acomodar estructuras muy variadas, y transmitir en todos los casos la señal de unión al ligando a su región C-terminal intracelular. Pero quizás lo más característico de los TLRs sea su dominio intra-citoplásmico (dominio TIR), que tiene gran homología al del receptor de IL-1 (13).

4. TLRs Y SEÑALES PRO-INFLAMATORIAS

La disposición de un dominio TIR permite a los receptores TLRs transmitir señales intracelulares que conectan con la activación génica en el núcleo (Figura 4).

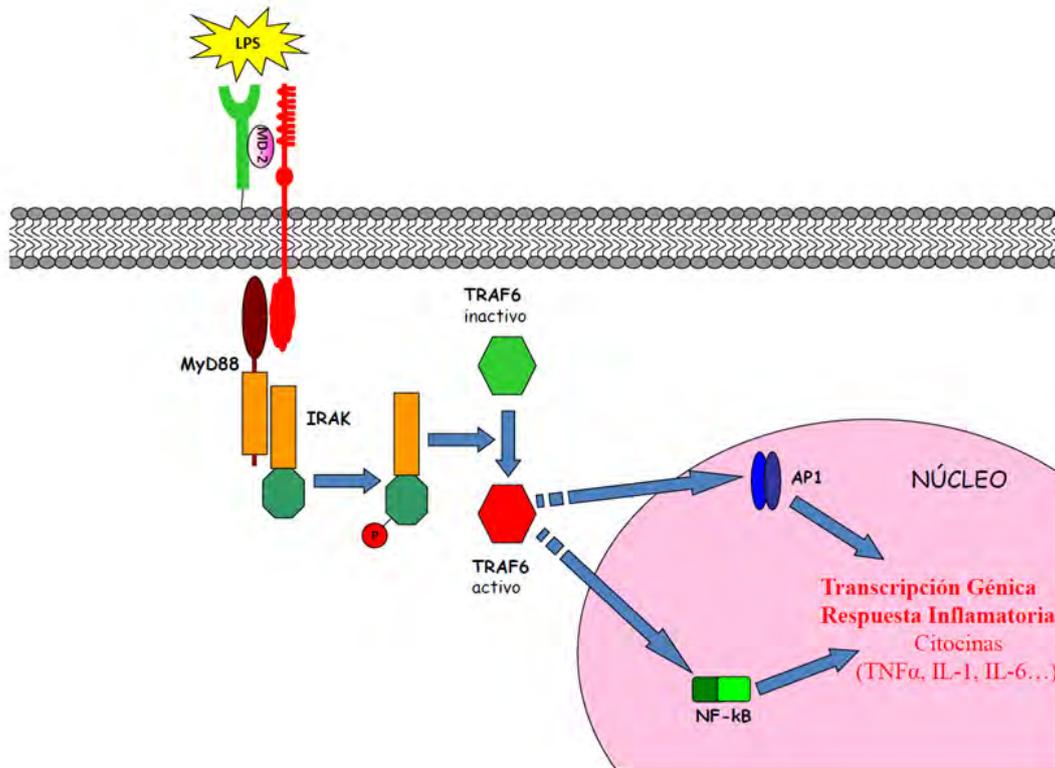


Figura 4.- Vía de Señalización intracelular a través de TLR4 e inducción de genes de la respuesta inflamatoria.

La cascada de señalización que desencadena la activación del dominio TIR se estableció en el marco del Receptor para IL-1 (14,15). Mediante este dominio, los TLRs conectan con las proteínas adaptadoras MyD88, MAL/TYRAP, TRIF o TRAM. Los diferentes TLRs, utilizan diversas combinaciones de estas proteínas que van a reclutar a su vez los complejos señalizadores interaccionando con IRAK (Kinasa asociada al Receptor de IL-1) y activando a TRAF6 (Factor Asociado al Receptor de TNF 6). Este factor estimula entonces a las proteínas NIK y TAK-1, que confluyen en la activación de las kinasas MAP e I κ B. Finalmente, se translocan al núcleo los Factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, dando lugar a la activación de la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, como TNF alfa, IL-1, IL-6; quimiocinas y moléculas de adhesión (Figura 4).

Por tanto, los TLRs actúan como auténticos receptores para patrones estructurales microbianos y como elementos señalizadores desencadenantes del proceso inflamatorio.

5. OTRAS FAMILIAS DE RECEPTORES PARA COMPONENTES MICROBIANOS

Las líneas de investigación mencionadas anteriormente han dado pie a ampliar el concepto de la inmunidad innata como defensa frente a señales de peligro, tanto extracelulares como intracelulares, a otras familias de receptores estructuralmente diferentes de los TLRs, como las lectinas animales de tipo C, las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos y beta-glucanos, los receptores RIG-like o los NLR (receptores tipo Nod) (16). Junto a los TLRs, su proyección y relevancia se ha mostrado extraordinaria en enfermedades crónicas no infecciosas de gran prevalencia en la población, como son los trastornos autoinmunes y cardiovasculares. Así, se ha observado que los TLRs también pueden unir moléculas endógenas como LDLox, componentes de la matriz extracelular, o proteínas de choque térmico o estrés (17, 18). El conocimiento generado por estos estudios sobre los mecanismos de señalización de los TLRs, abren nuevas perspectivas en los tratamientos tanto para enfermedades inflamatorias crónicas como las cardiovasculares.

6. EL DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Tras identificar y definir por primera vez este nuevo tipo de células inmunes en el año 1973 (19), el Prof. Ralph Steinman hubo de demostrar inequívocamente que se trataba de un linaje celular distinto al de los macrófagos mostrando, por tanto, características de diferenciación y función propias. La lucha del Prof. Steinman para que la relevancia de las células dendríticas, en la encrucijada de la respuesta innata con la respuesta adaptativa, fuera reconocida por la comunidad científica fue a la vez titánica y elegante. Abrió así un nuevo área de investigación, demostrando que las células dendríticas representan el eslabón perdido entre respuesta inmune innata y adaptativa, siendo esenciales para el inicio de la respuesta inmune adaptativa y por tanto para una completa y eficiente defensa del organismo.

Las células dendríticas capturan microbios, mediante su repertorio de receptores para patrones moleculares microbianos, como los TLRs, maduran como respuesta al patógeno detectado y se dirigen a los órganos linfoides, donde presentan los antígenos a los linfocitos, células del sistema inmune adaptativo. De esta manera, las células dendríticas informan de la presencia de patógenos, iniciándose así la activación y diferenciación celular que dará lugar a los diferentes tipos de linfocitos efectoras.

7. ONTOGENIA DE LOS MACRÓFAGOS Y LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Los monocitos, macrófagos y células dendríticas (DCs) son componentes esenciales en la regulación de la respuesta innata frente a infecciones por

microorganismos. Los monocitos que circulan en la corriente sanguínea proceden de un precursor de la médula ósea común para monocito/macrófago/DC (MDP), con un fenotipo característico Lin⁻ cKit^{hi} CD115⁺ CX3CR1⁺ Flt3⁺. Este precursor puede originar tanto macrófagos como DCs plasmacitoides (pDCs) y DCs convencionales (cDCs) (Figura 5); estas células juegan un papel esencial en el desarrollo del proceso inflamatorio.

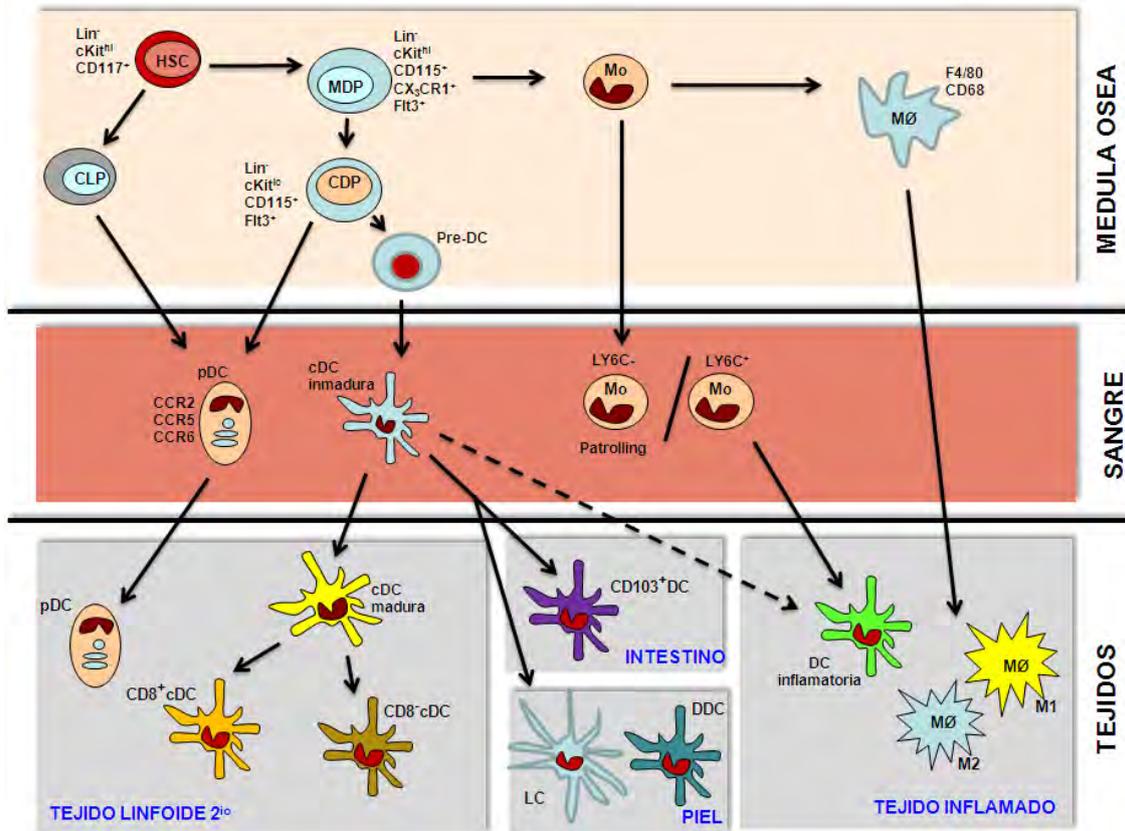


Figura 5.- Esquema de la Ontogenia de las células mieloides (macrófagos, monocitos y células dendríticas) a partir de un precursor común hematopoiético de médula ósea. *Abreviaturas:* HSC: célula madre hematopoiética, MØ: macrófago, Mo: monocito, MDP: precursor común de macrófago/monocito/célula, CDP: precursor común de célula dendrítica, CLP: precursor linfoides común, pDC: célula dendrítica plasmacitoide, cDC: célula dendrítica convencional, LC: célula de Langerhans, DDC: célula dendrítica dermal.

Los monocitos Ly6C⁻ generan los macrófagos residentes de tejido que se encuentran en el bazo, hígado, pulmón, o intestino, y que realizan un papel de centinelas en dichos tejidos, mientras que los monocitos Ly6C⁺ se diferencian a macrófagos inflamatorios en respuesta a infecciones o estímulos inflamatorios. Estos últimos pueden ser de dos tipos: los macrófagos activados clásicos (M1) o pro-inflamatorios, con propiedades anti-microbianas, y los activados alternativos (M2) o anti-inflamatorios, que ejercen un papel muy importante en los procesos de cicatrización y generación de fibrosis (20) (Figura 5). Aunque el origen de los macrófagos asociados a los tumores (TAMs) no está claro aún, ambos tipos de

macrófagos residentes o inflamatorios pueden diferenciarse a TAMs, adquiriendo propiedades inmunosupresoras (21).

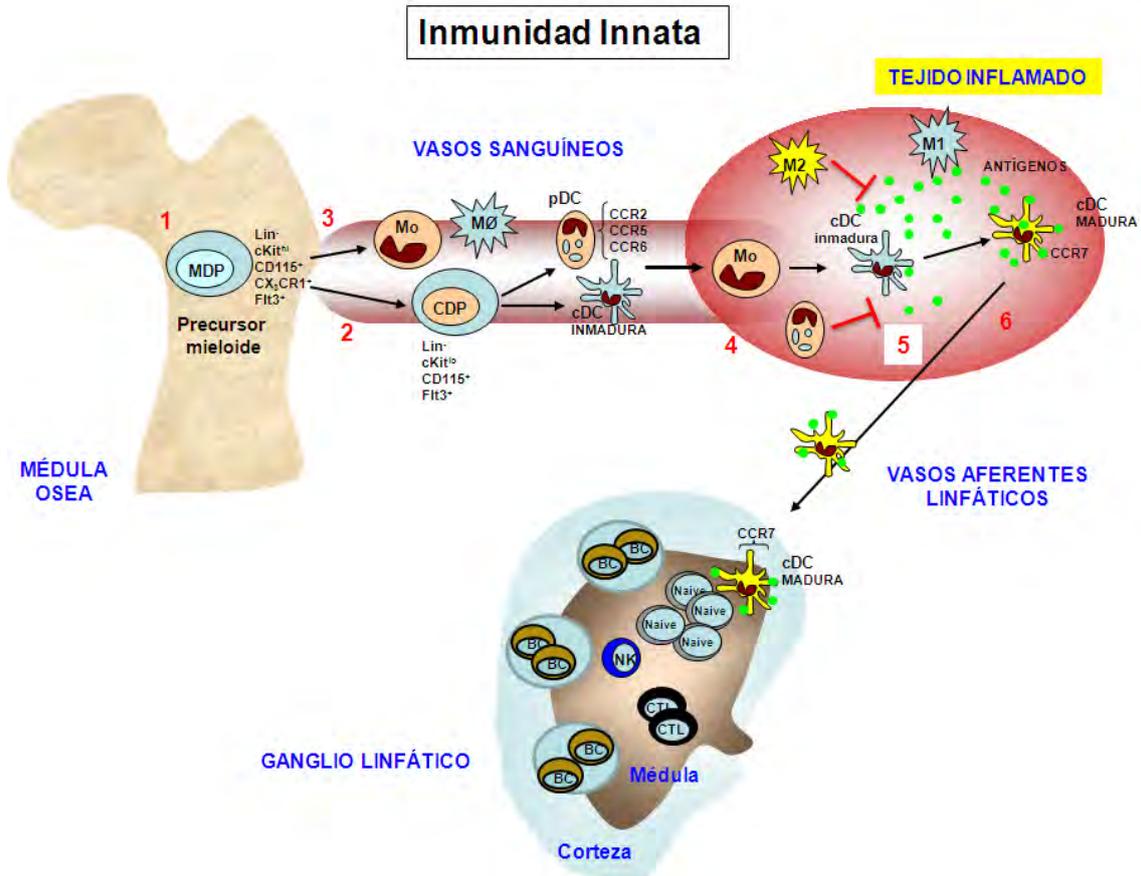


Figura 6.- Esquema de los eventos principales que tienen lugar durante la inmunidad innata. (1) Las células mieloides se originan en la médula ósea a partir de un precursor común, dando lugar a los distintos linajes de células dendríticas (2) y de monocitos /macrófagos (3). En respuesta a una inflamación/infección en un determinado tejido estas células mieloides son movilizadas hacia el sitio de inflamación (4) donde son capaces de interactuar con el antígeno/patógeno, entre otros a través de los receptores TLR y ejercer una primera línea de defensa frente a estos eventos (5). Las células dendríticas son capaces de captar estos antígenos y migrar a los ganglios linfáticos (6) donde presentan estos antígenos a las células T, siendo así la célula clave en la iniciación de las respuestas inmunes adaptativas.

Se han descrito además otras subpoblaciones de monocitos como los Ly6C+ Gr-1+ que migran a las mucosas y participan en la inmunidad frente a protozoos, o la subpoblación Ly6C- CD115+ Gr1+ que patrulla los vasos sanguíneos (22-24). Los procesos de diferenciación mieloides poseen gran plasticidad; así, se ha observado en situaciones de infección e inflamación, la migración de los monocitos a los sitios de inflamación y su diferenciación a DCs (25). Sin embargo, en otras situaciones como en respuestas de daño isquémico miocárdico, los monocitos pueden ejercer un efecto anti-inflamatorio. Los monocitos Ly6C+ pueden ser movilizadas desde la médula ósea hacia los tejidos inflamados por un mecanismo dependiente de CCR2, y una vez allí, pueden

diferenciarse a DCs productoras de TNF(Tip DCs), macrófagos M1 o DCs inflamatorias.

La ontogenia, desarrollo y homeostasis de las DCs está controlado por el receptor FLT3, de la familia de receptores tirosina quinasa similar a *fms*, que es responsable de la diferenciación de DCs a partir de un precursor CX3CR1+ CD115+ común (CDP) para pDCs y cDCs (26-28) (Figura 5). La expresión diferencial de moléculas de adhesión y receptores de migración es esencial para el reclutamiento de los precursores mieloides de macrófagos y DCs a los diferentes tejidos, con el fin de ejercer allí sus funciones (29) (Figura 5 y 6).

8. SUBTIPOS Y FUNCIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

El papel de las células dendríticas es crítico en el equilibrio inmunogenicidad-tolerancia. Las DCs pueden clasificarse en dos grandes categorías; convencionales (cDCs) y plasmacitoides (pDCs) (30). En primer lugar, las cDCs se han caracterizado por ser, esencialmente, células con gran capacidad presentadora de antígeno y de estimulación de la respuesta de los linfocitos T, con fenotipo CD11c+ CD11b+. La migración de cDCs inmaduras a los tejidos inflamados es dependiente de la expresión de los receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 y CCR6 (Figura 6). Tras la captura de antígeno en tejidos inflamados o en los sitios de infección, las cDCs maduran, disminuyendo la expresión de estos receptores de quimiocinas y aumentando la de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y ligandos co-estimuladores CD80 y CD86. Así, aumentan su capacidad presentadora de antígeno. Además, tras su maduración, las cDCs comienzan a expresar el receptor de quimiocinas CCR7, que les permite migrar a los ganglios linfáticos para presentar allí el antígeno a los linfocitos T y así activarlos (29, 31) (Figura 7).

Por otra parte, las pDCs, identificadas en ratón como CD11c^{int} B220+ (32), se encuentran en médula ósea, sangre, timo y ganglios, formando parte del mecanismo de defensa inicial frente a las infecciones virales ya que son capaces de producir grandes cantidades de Interferon-alfa tras reconocimiento de ácidos nucleicos virales por sus TLR7 y 9. Además, las pDCs pueden también activar a linfocitos T induciendo respuestas T antígeno específicas, así como a otros componentes del sistema inmune como las células NKs. Existen, sin embargo, evidencias de que las pDCs pueden desempeñar una función importante no sólo en la inmunidad viral, sino también durante la inducción de tolerancia en las enfermedades autoinmunes. Debido a su menor expresión de MHC-II y de moléculas co-estimuladoras que las cDCs, se ha postulado un papel muy relevante para las pDCs en el mantenimiento de la tolerancia frente a antígenos propios. En este sentido, las pDCs inmaduras promueven la diferenciación de los linfocitos T

reguladores, integrantes de la respuesta tolerogénica, tanto in vitro como in vivo en modelos de tolerancia de asma alérgica o de trasplantes cardiacos (32, 33).

Inmunidad Adaptativa

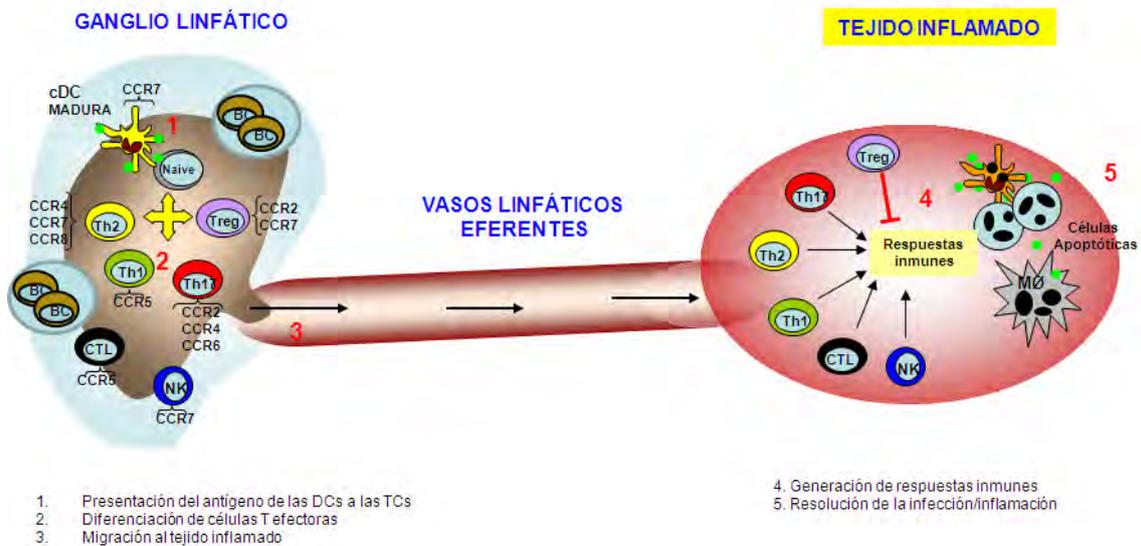


Figura 7.- Esquema de los eventos principales de la inmunidad adaptativa y generación de los diferentes tipos de células T. En los ganglios linfáticos las células dendríticas presentan los antígenos a las células T vírgenes (1), estas a su vez se activan y se diferencian a los diferentes tipos de células T efectoras Th1, Th2, Th17 o células T reguladoras (2). Las células T efectoras y de memoria que se generan en estos procesos migran a través de los vasos linfáticos aferentes a los tejidos inflamados (3) para ejercer su función en la regulación de las respuestas inmunes (4) o en la protección frente a patógenos (5), constituyendo así la segunda línea de las respuestas inmunes.

9. INTERACCIONES DC-LINFOCITOS T. LA SINAPSIS INMUNE

El intercambio de información entre células, homólogas o heterólogas, es uno de los ejemplos más importantes de la sofisticación de los sistemas nervioso e inmune en vertebrados. La formación de la sinapsis inmunológica, a diferencia de la sinapsis neuronal, es un proceso transitorio. La formación de la sinapsis inmunológica incluye varias etapas secuenciales. En primer lugar, se produce la exploración por parte del linfocito T de la membrana de la célula presentadora de antígeno (APC) que implica a determinadas moléculas de adhesión como la integrina LFA-1 y sus ligandos ICAM-1, e ICAM-3; esta etapa es independiente de antígeno. En segundo lugar, cuando el receptor de los linfocitos T (TCR) reconoce al antígeno presentado por las moléculas MHC de la APC, se inducen señales activadoras y se produce la segregación de los SMACs (Complejos Supramoleculares de Activación). Por último, se lleva a cabo la secreción polarizada guiada por la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) (34-37) (Figura 8).

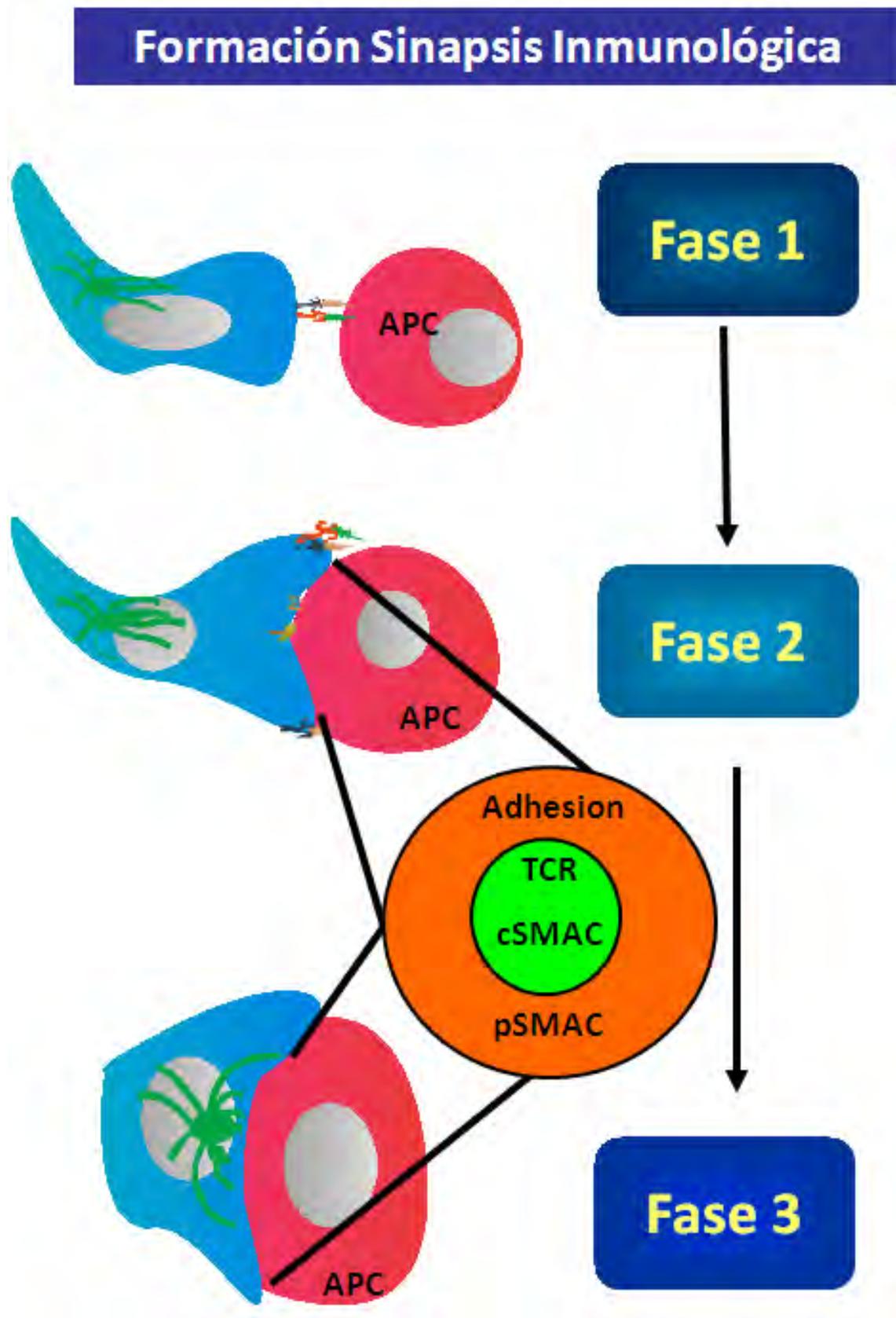


Figura 8.- Etapas en la formación y maduración de la sinapsis inmunológica: congregación, segregación de receptores y secreción polarizada.

Las moléculas implicadas en la formación de la sinapsis inmunológica se reorganizan espacial y temporalmente en la célula T formando una plataforma especializada en la zona de la célula T que está en contacto estrecho con la APC y que permite el diálogo celular. Este reconocimiento específico conlleva que se establezcan de múltiples interacciones concertadas entre parejas de receptores de superficie en ambas células. Una observación detallada al microscopio de la sinapsis inmune revela la distribución de las moléculas implicadas en el lado del linfocito T en dos anillos concéntricos: un anillo central (cSMAC), donde se agrupan el receptor de las células T (TCR) unido al complejo antígeno-MHC de la célula presentadora; y un anillo periférico de adhesión denominado pSMAC (complejo supra-molecular de activación periférico) donde se concentran los receptores de adhesión celular, entre ellos LFA-1 y su ligando ICAM-1. Esta distribución diferencial es necesaria para la completa activación de la célula T ya que permite la regulación y amplificación espacio-temporal de las rutas de señalización intracelular provenientes del TCR. Este proceso de distribución de receptores es posible gracias a su integración en pequeñas islas en la membrana plasmática que favorecen la formación de agregados así como su interacción con el citoesqueleto celular, que proporciona la plataforma física que sustenta toda la estructura de la sinapsis (38-40). Por otra parte, en la APC, en la zona de contacto con el linfocito T, las moléculas de MHC que presentan el antígeno y las moléculas de adhesión ICAM-1 y -3 también se disponen congregadas y organizadas, facilitando así su interacción con los receptores en la parte simétrica de la célula T (41). Se ha descrito además, que existen estrictas jerarquías temporales en el reclutamiento de moléculas de señalización a la sinapsis, de forma que se produce una ordenación temporal de las señales. Tanto las cDCs como las pDCs poseen la capacidad de formar sinapsis productivas y completas con los linfocitos T de forma antígeno-específica (42).

Una vez efectuado el reconocimiento entre la célula T y la APC y establecidos los contactos adherentes y antígeno-dependientes, la célula T se activa y pasa a diferenciarse hacia uno de los subtipos de células T, ya sean efectoras o colaboradoras (T-helper, Th), que son fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmune adquirida (43, 44). Dependiendo del microambiente de citocinas y el tipo de célula APC que los activa, los linfocitos T CD4 pueden dar lugar a: i) Células Th1: que producen grandes cantidades de IFN gamma con el que activan propiedades microbidas en los macrófagos para así resistir infecciones intracelulares de patógenos facultativos u obligados (ej: bacterias intracelulares). ii) Células Th2: Productoras de citocinas IL-4, -5 y -13 que permiten reclutar otros leucocitos para resistir infecciones por helmintos así como cooperar con los linfocitos B para producir diferentes isotipos de inmunoglobulinas. iii) Células Th17: Productoras de IL-17, que movilizan a fagocitos, neutrófilos, para resistir infecciones por bacilos extracelulares. iv)

Células T reguladoras (Treg): algunas células T CD4⁺ son inducidas a producir IL-10, diferenciándose a células Foxp3⁺ con capacidad de suprimir la función de las demás Th1, Th2 y Th17 (Figura 9).

Presentación Antigénica / Diferenciación Linfocitos T

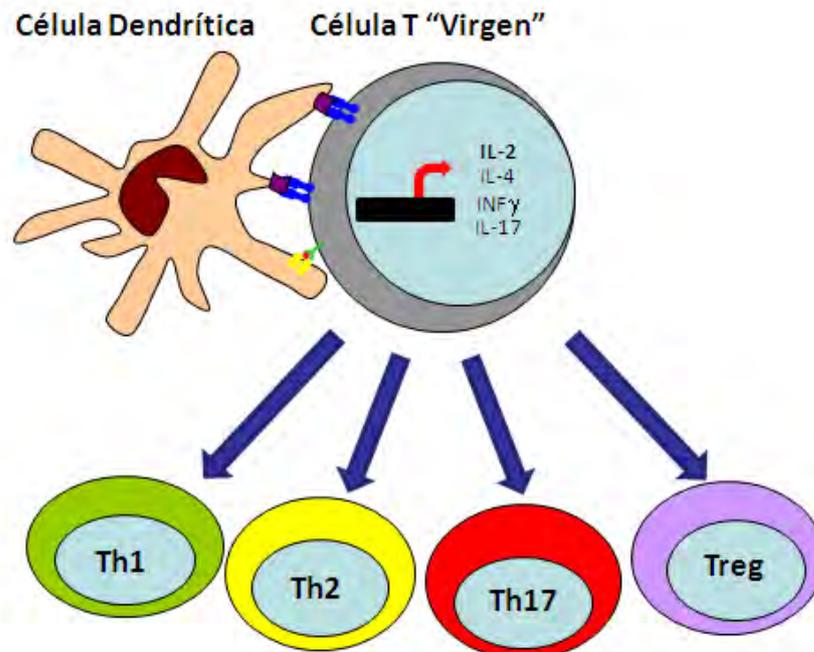


Figura 9.- Interacción linfocito T- Célula dendrítica y diferenciación de linfocitos T CD4 efectores.

La interfaz de contacto entre una célula T y una APC se forma para facilitar la comunicación entre ambas células. Sin embargo, se desconoce por qué las moléculas se reordenan formando los SMACs característicos de la sinapsis inmunológica madura. Una posibilidad es que la formación y maduración de los SMACs faciliten la activación secuencial del linfocito T mediante el agrupamiento selectivo de moléculas de superficie, así como el cese y la terminación adecuada de la señal de activación. Además, este reagrupamiento de moléculas de la célula T en SMACs supone la formación de un área especializada para que vesículas cargadas de mediadores se anclen y sean secretadas a la zona de contacto con la célula presentadora de antígeno. Existen numerosas evidencias que apuntan a que la secreción polarizada es una de las funciones principales de la sinapsis inmune (45, 46).

Los mensajes que se transmiten las células inmunes mediante la sinapsis inmunológica pueden ser mensajes de vida o mensajes de muerte. Así, las señales que recibe, desde un linfocito T colaborador, una APC, tipo célula dendrítica o

linfocito B, favorecen su supervivencia y permiten que una célula específica, que está transmitiendo mensajes sobre antígenos presentes en el organismo permanezca más tiempo activa, de modo que cumpla su función comunicadora con mayor eficiencia. Estas señales implican tanto la proliferación y activación como la secreción y transferencia de citocinas y factores de crecimiento y supervivencia (45-48). Por el contrario, las señales que emite un linfocito T citotóxico a una célula infectada por un virus o bacteria o a una célula tumoral, son inductoras de muerte, que ponen en marcha programas de muerte celular, como la apoptosis (46).

10. TERAPIAS BASADAS EN LA INMUNOMODULACIÓN POR CÉLULAS DENDRÍTICAS DE LA RESPUESTA INMUNE

El potencial de las DCs es indudable en protocolos de vacunación, así como en nuevas terapias de inmunopotenciación frente a tumores. El uso de células dendríticas, estimuladas y expandidas *in vitro*, o bien combinadas con otras terapias más convencionales, es un área emergente y en expansión en medicina.

Actualmente, se está intentado desarrollar nuevas terapias para producir vacunas contra el cáncer que permitan mejorar los tratamientos actuales. Por ejemplo, existen ensayos con distintos adyuvantes que son inyectados en la zona lesionada por el tumor para aumentar su inmunogenicidad. Además se están poniendo a punto sistemas que incluyen la administración sistémica o local de células dendríticas que reaccionan frente al tumor, o agentes que causan la depleción o eliminación de células T reguladoras. También se ha estudiado el efecto de fármacos que eliminan células mieloides supresoras en el área del tumor. Estos tipos de inmunoterapias intentan coordinar la comunicación entre células del sistema inmune, de modo que sean capaces de reconocer y hacer desaparecer el tumor, igual que ocurre frente a determinados virus o bacterias para los que existen vacunas efectivas (49).

Conseguir vacunas efectivas frente a determinados procesos como el cáncer, implica poder modular el sistema inmune adaptativo de modo que sea más inmunogénico y menos tolerogénico (Figura 10). Igualmente, se está estudiando el posible uso de poblaciones de células dendríticas con potencial tolerogénico, es decir, capaces de mantener inactivo al sistema inmune, para combatir procesos donde el sistema inmune se activa de forma no deseada, dando lugar a una patología como es el caso de las enfermedades autoinmunes, alergias y trasplantes de órganos (Figura 10) (50, 51).

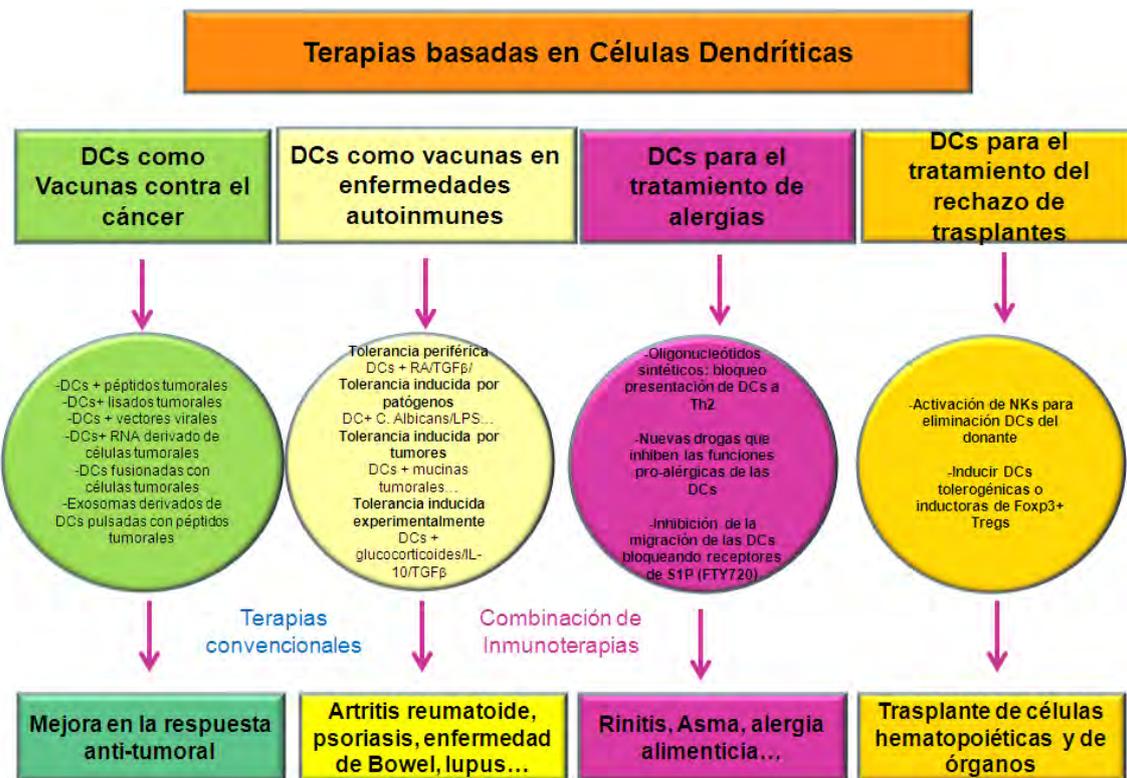


Figura 10.- Terapias basadas en la inmunomodulación por células dendríticas.

11. REFERENCIAS

1. Janeway, C. (1989). Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 54, 1-13.
2. Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger and the extended family. Annu Rev Immunol., 12, 991-1045.
3. Anderson, K.V., Bokla, L., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell, 42, 791-798.
4. Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., & Boman, H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. Nature, 292, 246-248.
5. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell, 86, 973-983.
6. Hoffmann, J.A., & Reichhart, J.M. (2002) Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol., 3, 121-126.
7. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C.A. Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 388, 394-397.
8. Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science, 284, 1313-1318.
9. Gay, N.J., Keith, F.J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature, 351, 355-356.
10. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 282, 2085-2088.
11. Beutler, B.A. (2009). TLRs and innate immunity. Blood, 113, 1399-1407.

12. da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., & Ulevitch, R.J. (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem.*, 276, 21129-21135.
- 13 Heguy, A., Baldari, C.T., Macchia, G., Telford, J.L., & Melli, M. (1992). Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem.*, 267, 2605-2609.
14. Muzio, M., Ni, J., Feng, P., Dixit, V.M., IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997, 278, 1612-1615.
15. Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, & M., Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.*, 187, 2097-2101.
16. Takeuchi, O., & Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
17. Seimon, T.A., Nadolski, M.J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., Harkewicz, R., Witztum, J.L., Tsimikas, S., Golenbock, D., Moore, K.J., & Tabas, I. (2010). Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.*, 12, 467-482.
18. Cole, J.E., Navin, T.J., Cross, A.J., Goddard, M.E., Alexopoulou, L., Mitra, A.T., Davies, A.H., Flavell, R.A., Feldmann, M., & Monaco, C. (2011). Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2372-2377.
19. Steinman, R.M., & Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*, 137, 1142-1162.
20. Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., & Randolph, G.J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol.*, 10, 453-460.
21. Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009, 27, 669-692.
22. Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., & al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325, 612-616.
23. Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., & al. (2008). Gr1(b) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 29, 306-317.
24. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., & al. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317, 666-670.
25. Shi, C., & Pamer, E.G., Monocyte recruitment during infection and inflammation. (2011). *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 762-774.
26. Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guermonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K. & al. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*, 324, 392-397.
27. Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N. & al. (2009). CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.*, 206, 595-606.
28. Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H. & al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med.*, 206:1853-1862.
29. Alvarez, D., Vollmann, E.H., & von Andrian, U.H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*. 29, 325-342.
30. Steinman, R.M., & Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449, 419-426.

31. Barreiro, O., Martín, P., González-Amaro, & R., Sánchez-Madrid, F. (2010). Molecular cues guiding inflammatory responses. *Cardiovasc Res.*, 86, 174-182.
32. Martín, P., Del Hoyo, G.M., Anjuère, F., Arias, C.F., Vargas, H.H., Fernández-L, A., Parrillas, V., & Ardavín, C. (2002). Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood*, 100, 383-390.
32. Lambrecht, B.N., & Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*, 31, 412-424.
33. Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., & al. (2006). Alloantigenpresenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol.*, 7, 652-662.
34. Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., & Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.*, 39582-39586.
35. Fooksman ,D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristán, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A., & Dustin, M.L., (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol.*, 28, 79-105.
36. Montoya, M.C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., & Sánchez-Madrid, F. (2002). Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol. Rev.*, 186, 68-82.
37. Martín-Cófreces, N.B., Robles-Valero, J., Cabrero, J.R., Mittelbrunn, M., Gordón-Alonso, M., Sung, C.H., Alarcón, B., Vázquez, J., & Sánchez-Madrid, F. (2008). MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol.*, 182, 951-962.
38. Sánchez-Madrid, F., & del Pozo, M.A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*, 18, 501-511.
39. Billadeau, D.D., Nolz, J.C., & Gomez, T.S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol.*, 7, 131-143.
40. Vicente-Manzanares, M., & Sánchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Rev. Immunol.*, 4, 110-122.
41. de la Fuente, H., Mittelbrunn, M., Sánchez-Martín, L., Vicente-Manzanares, M., Lamana, A., Pardi, R., Cabañas, C., & Sánchez-Madrid, F. (2005). Synaptic clusters of MHC class II molecules induced on DCs by adhesion molecule-mediated initial T-cell scanning. *Mol Biol Cell.*, 16, 3314-3322.
42. Mittelbrunn, M., Martínez del Hoyo, G., López-Bravo, M., Martín-Cofreces, N.B., Scholer, A., Hugues, S., Fetler, L., Amigorena, S., Ardavín, C., & Sánchez-Madrid, F. (2009). Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood*, 113, 75-84.
43. Zhu, J., & Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112, 1557-1569.
44. O'Shea, J.J., & Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 327, 1098-1102.
45. Huse, M., Quann, & E.J., Davis, M.M. (2008). Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat Immunol.*, 9, 1105-11.
46. Stinchcombe, J.C., & Griffiths, G.M. (2007). Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 23, 495-517.
47. Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., & Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.*, 2, 282.
48. Riol-Blanco, L., Delgado-Martin, C., Sanchez-Sanchez, N., Alonso, C.L., Gutierrez-Lopez, M.D., Del Hoyo, G.M., Navarro, J., Sanchez-Madrid, F., Cabanas, C., Sanchez-Mateos, P., & Rodriguez-Fernandez, J.L. (2009). Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells. *Nat Immunol.*, 10, 753-760.

49. Perez-Gracia, J.L., Berraondo, P., Martínez-Forero, J., Alfaro, C., Suarez, N., Gurrpide, A., Sangro, B., Hervas-Stubbs, S., Ochoa, C., Melero, J.A., & Melero, I. (2009). Clinical development of combination strategies in immunotherapy: are we ready for more than one investigational product in an early clinical trial? *Immunotherapy*, 1, 845-853.
50. Maldonado, R.A., & von Andrian, U.H. (2010) How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol.*, 108, 111-65.
51. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev.*, 241, 206-227.

Pectina: Usos Farmacéuticos y Aplicaciones Terapéuticas

Pseydy Luz Mamani Crispín¹, Roberto Ruiz Caro¹, M^a Dolores Veiga^{1,2*}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, España.²Unidad de Biotransformaciones Industriales, Parque Científico de Madrid PTM, 28760-Tres Cantos, Madrid, España. Recibido el 31 de octubre de 2011.

e-mail: mdveiga@farm.ucm.es

RESUMEN

La pectina es un polisacárido de origen vegetal que posee excelentes características de gelificación, y biocompatibilidad, por lo que ha sido ampliamente estudiada como excipiente en diversas formas farmacéuticas para modular la liberación de moléculas activas. La pectina permanece intacta en la parte alta del tracto gastrointestinal, y sólo es degradada por la microflora del colon. Por tal motivo, se ha incluido en esta revisión el desarrollo de diferentes formulaciones de liberación colónica de fármacos basadas en este polisacárido para tratar afecciones locales como el cáncer de colon y la enfermedad de Crohn. También se incluyen diversos estudios acerca de aplicaciones terapéuticas de la pectina como coadyuvante en diferentes patologías digestivas como el reflujo gastroesofágico y la diarrea persistente. El efecto que, sobre los niveles de glucosa, insulina y lípidos en plasma, puede tener una dieta rica en pectina es así mismo analizado.

Palabras clave: Pectina; Liberación controlada; Liberación colónica; Aplicaciones terapéuticas.

ABSTRACT

Pectin: Pharmaceutical and Therapeutic Uses

Pectin is a polysaccharide of vegetarian origin, combining both excellent gelation and biocompatibility characteristics, and thus has been widely studied as an excipient in different pharmaceutical forms in order to modulate the release of active molecules. Pectin remains intact in the upper gastrointestinal tract and only gets degraded by colonic micro-flora. Hence, different formulations based on this polysaccharide, which have been developed to target drugs to the colon and treat local affections like colon cancer and Crohn's disease, were included in this review. Also, different studies on therapeutic uses of pectin as an adjuvant in various digestive pathologies such as the gastro-esophageal reflux and persistent diarrhea have been discussed. The effects of a rich pectin-diet over the glucose, insulin and lipid plasma levels are also commented.

Key words: Pectin; Controlled delivery; Colonic delivery; Therapeutic uses.

1. INTRODUCCIÓN

La pectina es una mezcla compleja de polisacáridos que constituye aproximadamente un tercio de las paredes celulares de las plantas superiores. En los últimos años ha adquirido gran interés pues sus aplicaciones pueden ser muy diversas en base a sus parámetros físico-químicos y a su biodegradabilidad. Se extrae de cáscaras de cítricos y de pulpa de manzana en condiciones ligeramente ácidas (1). Fuentes alternativas para la obtención de pectina son los residuos provenientes de la industria azucarera (remolacha), aceitera (semillas de girasol), etc (2).

Desde el punto de vista químico la pectina está compuesta por una cadena lineal de restos de ácido α -(1,4)-D-galacturónico cuyos grupos carboxílicos se encuentran parcialmente metoxilados (Figura 1) (3). Debido a la complejidad de su estructura el peso molecular de la pectina está comprendido entre 50.000 y 180.000 daltons (4). En un medio con pH neutro las cadenas de este polisacárido se encuentran cargadas negativamente y su pKa es aproximadamente 3,5 (5).

Las pectinas se dividen en dos grupos principales, en función de su grado de esterificación, clasificándolas en: pectinas de alto grado de metoxilación (HM), pectinas de bajo grado de metoxilación (LM) y en otras sustancias pécticas como las pectinas desmetiladas o moléculas amidadas (5). Las pectinas HM presentan valores de metoxilación comprendidos entre el 60 y 75%, mientras que este valor disminuye hasta un 20-40% en las pectinas LM. Esta diferencia en el grado de metoxilación influye directamente en la capacidad formadora de geles de cada

pectina. Así, las pectinas HM requieren un intervalo de pH próximo a 3 para formar geles, son en general solubles en agua caliente y deben contener un agente dispersante, como la dextrosa, para evitar la formación de grumos durante el proceso de gelificación. Por el contrario, las pectinas LM producen geles independientemente del pH del medio, pero requieren la presencia de una cantidad controlada de iones calcio u otros cationes divalentes, por lo cual son de mayor interés que las pectinas HM para su empleo en tecnología farmacéutica (7).

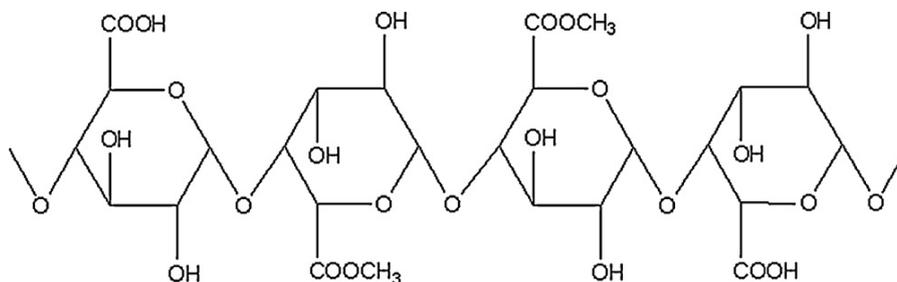


Figura 1.- Estructura química de la pectina (6)

Así mismo, pueden utilizarse en tratamientos de reducción de peso, ya que su ingesta provoca una sensación de saciedad, por su gran capacidad para absorber líquidos, reduciendo de este modo el consumo de alimentos por parte de los individuos (8).

2. USOS FARMACÉUTICOS

La pectina se encuentra inscrita en la FDA como un aditivo seguro sin límites de consumo diario (9), por lo que ha sido ampliamente utilizada como excipiente en la formulación de comprimidos matriciales, geles, cubiertas de formas farmacéuticas, etc.

Kubo y colaboradores (10, 11) han desarrollado formulaciones de pectina, con capacidad de gelificar “in situ”, para liberación sostenida de fármacos. Así, se han utilizado diferentes soluciones acuosas diluidas de pectina LM con cationes calcio, para favorecer la complejación, como vehículo para la administración de paracetamol o ambroxol, y se ha comprobado que permanecen en el estómago de rata, mostrando liberación sostenida de ambos fármacos durante períodos de 6 horas. Itoh y colaboradores (12) estudiaron el posible sinergismo entre pectina y xiloglucano en formulaciones diseñadas para obtener liberación sostenida de paracetamol. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de pectina en la formulación mixta de pectina-xiloglucano es esencial para conseguir controlar la liberación del fármaco debido a la formación del gelificado “in situ”.

Éstas y otras investigaciones muestran que la combinación de pectina con iones divalentes puede utilizarse para optimizar el control de la liberación de fármacos en sistemas elaborados con pectina, así como para ajustar la velocidad de liberación del principio activo. También se ha observado que incrementando la cantidad de iones divalentes en la formulación se produce un mayor grado de reticulación y agregación en el sistema (4). Sin embargo, un exceso de iones calcio origina un fenómeno de pre-gelificación que provoca una mayor velocidad de liberación del fármaco (5), concluyéndose que la cantidad óptima de iones calcio se encuentra entre 15 y 30 mg por gramo de pectina LM (13).

Los hidrogeles formados con polímeros naturales absorben y retienen grandes cantidades de agua y forman un material blando en contacto con los fluidos acuosos del organismo, lo cual contribuye a la biodegradabilidad y biocompatibilidad de este material. Considerando estas características Mishra y colaboradores (14) han desarrollado hidrogeles de pectina/polivinil pirrolidona (PVP) utilizando como agente reticulante el glutaraldehído. Los resultados obtenidos mostraron que se produce una interacción por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la pectina y los carboxilos de la PVP. Este hidrogel presenta hinchamiento pH-dependiente, que a su vez controla la liberación del fármaco modelo (ácido salicílico). Por otro lado, los ensayos de viabilidad sobre células del melanoma murino B16 mostraron que todos los hidrogeles de pectina/PVP estudiados no producen ningún efecto citotóxico significativo en estas células, lo que pone de manifiesto su biocompatibilidad. Los resultados permiten concluir que los hidrogeles elaborados con pectina/PVP son candidatos prometedores para diferentes aplicaciones biomédicas. Posteriormente, estos mismos autores desarrollaron hidrogeles, en medio ácido, a partir de una pectina modificada químicamente con etanolamida, utilizando como agente reticulante el glutaraldehído. El hidrogel obtenido resultó biocompatible y capaz de liberar por difusión el fármaco modelo (ácido salicílico), por lo que los autores consideran que esta membrana puede ser estudiada como sistema transdérmico de liberación de fármacos o como material de apósito para heridas (15).

Se ha investigado la capacidad que tiene la pectina como vehículo en sistemas de transferencia génica no viral debido a que es un compuesto biodegradable y de baja citotoxicidad e inmunogenicidad. Así, Katav y colaboradores (16) han desarrollado sistemas para vehicular genes a partir de pectina modificada químicamente. La pectina se modificó con diferentes grupos aminos cargados positivamente a pH fisiológico, las cuales se complejaron con DNA de plásmidos. Los resultados obtenidos mostraron que todas las pectinas modificadas fueron capaces de formar complejos con el DNA de plásmido. Sin embargo, la eficacia de complejación y transfección del sistema se vio influenciada por el tipo de grupo amino utilizado en cada modificación, observándose que el

mejor fue el de Pectina-NH₂-Q (Q=N+(CH₃)₃). Así mismo, se observó que el peso molecular de la pectina condicionaba la interacción con el DNA y la estabilidad del complejo aumenta con el peso molecular del polímero. Estos resultados ponen de manifiesto que la pectina modificada resultó un vehículo prometedor y atractivo para ser aplicado en transferencia génica no viral.

Algunos polisacáridos naturales de origen vegetal y bacteriano están involucrados en el crecimiento de organismos y en la diferenciación intercelular por la regulación del intercambio iónico en la superficie celular. Además son capaces de proteger organismo vivos al actuar como una barrera frente a las agresiones externas. Se han ensayado microesferas de pectina y pectina-RGD (pectina modificada con la secuencia Arg-Gly-Asp) como vehículo de células capaces de estimular la formación de tejido óseo. Los preosteoblastos inmovilizados en ambos tipos de microesferas mantenían una viabilidad constante de hasta 29 días y eran capaces de diferenciarse. El péptido RGD en la estructura de la pectina mejoraba la adhesión celular y su proliferación dentro de la microesfera, además no sólo las células crecían en el interior, sino que eran capaces de salir de la microesfera y organizar estructuras tridimensionales produciendo una matriz extracelular mineralizada. Estos prometedores resultados sugieren que la pectina puede ser utilizada como un vehículo celular inyectable para regenerar el tejido óseo (17).

Dentro de las formulaciones de liberación controlada de fármacos, que se administran por vía oral, están adquiriendo gran interés para los investigadores las formulaciones de liberación colónica, las cuales pueden resultar ventajosas para la administración por vía oral de péptidos y otros fármacos, que se degradarían en la zona alta del digestivo, o como medio de vehiculizar fármacos que deban actuar en la zona colónica para el tratamiento de cáncer de colon, enfermedad de colon irritable, enfermedad de Crohn, etc.

La pectina, como otros polisacáridos, es capaz de atravesar de forma inalterada la mayor parte del tracto digestivo, pero al alcanzar el colon va a sufrir una biodegradación específica por las enzimas producidas por las bacterias que forman parte de la flora colónica. Estas enzimas fermentan la pectina originando gases como hidrogeno, dióxido de carbono y metano, y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato), los cuales ejercen un efecto protector frente a desórdenes intestinales agudos o crónicos (18).

Rubinstein y colaboradores (19), desarrollaron comprimidos matriciales de pectinato de calcio como vehículo para la liberación colónica de fármacos insolubles. Evaluaron la liberación de indometacina a partir de estos comprimidos en medios con diferentes valores de pH (desde 3,5 a 7,0) en presencia o ausencia de enzimas pectinolíticas, contenido fecal de ratas y *Bacteroides ovatus*. Los

resultados obtenidos mostraron que las matrices elaboradas con pectinato cálcico sufren degradación por las enzimas pectinolíticas o bacterias presentes en los diferentes medios, ocasionando una liberación total del fármaco al cabo de 2 horas en presencia de enzimas pectinolíticas (120 FDU/mL), 6 horas en presencia de *B. ovatus* y una liberación más lenta cuando el medio de disolución contiene restos fecales de ratas. Sin embargo, en todos los casos la liberación de indometacina fue superior a la obtenida cuando el ensayo se desarrollaba en medio sin estos agentes capaces de degradar la pectina. Así mismo, se observó que el pH del medio afecta a la liberación de indometacina debido a la solubilidad pH-dependiente del fármaco (insoluble a pH 3,5 y 6,2 y escasamente soluble a pH 7).

Considerando que la liberación de fármacos hidrosolubles a partir de matrices se produce tanto por simple difusión como por erosión de la matriz, diversos investigadores han estudiado formulaciones elaboradas con pectina o pectinato cálcico, como excipiente potencial para lograr la liberación colónica de fármacos hidrosolubles. Así, Ashford y colaboradores (20) han desarrollado matrices de fluoresceína (modelo de sustancia hidrosoluble) recubiertas con pectinas de diferentes grados de metoxilación, utilizando la técnica de recubrimiento por compresión para proteger la fluoresceína sódica que se encuentra en el núcleo y así asegurar su liberación en el colon. Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* mostraron que los comprimidos que se elaboraron con pectina HM (70% metoxilación) resultaron los más adecuados para conseguir una liberación colónica, ya que después de 5 horas de ensayo de disolución (2h en HCl 0,1M y 3h en medio de pH 7,4) se observó que el núcleo estaba seco y que la liberación de la fluoresceína sólo se produjo cuando en el medio de disolución había enzimas pectinolíticas. Los resultados *in vivo*, usando escintigrafía gamma en voluntarios, confirmaron los resultados *in vitro*, ya que en todos los casos las imágenes obtenidas mostraron que el comprimido se desintegra al llegar al colon ascendente.

Posteriormente, Rubinstein y colaboradores (21) estudiaron la utilidad de la técnica de recubrimiento por compresión para controlar la liberación de dos fármacos de diferentes solubilidades (indometacina e insulina) en la región del colon, utilizando pectinato de calcio como excipiente en la obtención de comprimidos matriciales y también como elemento formador de la cubierta. Los resultados *in vitro* mostraron que en el caso de la indometacina tanto los comprimidos matriciales como los comprimidos matriciales recubiertos permanecían inalterados en el medio que simulaba la parte alta del digestivo, pero al ponerlos en contacto con fluido intestinal simulado con enzimas pectinolíticas liberaban rápidamente el fármaco. En el caso de la insulina los ensayos realizados *in vivo* en perros demostraban una liberación prematura de la insulina incluso en la matriz recubierta. A partir de estos resultados los autores concluyeron que la

técnica de recubrimiento por compresión para obtener liberación colónica sólo es útil en el caso de fármacos poco hidrosolubles.

Prosiguiendo con el estudio del proceso de recubrimiento con pectina para la obtención de comprimidos de liberación colónica de fármacos, Wakerly y colaboradores (22) desarrollaron una película de recubrimiento a partir de una dispersión acuosa de pectina/etilcelulosa, para controlar la velocidad de liberación de paracetamol y conseguir una formulación de liberación en el colon. Los resultados obtenidos mostraron una menor velocidad de liberación del fármaco cuanto mayor era la cantidad de etilcelulosa en la película, y cuanto mayor era el grosor de la capa de recubrimiento, demostrando de esta forma que la combinación de pectina/etilcelulosa puede proporcionar la protección necesaria al sistema en la parte superior del tracto gastrointestinal, permitiendo la degradación específica de la pectina por las enzimas de la flora colónica.

Dado que la pectina por sí sola no resulta en todos los casos totalmente eficaz para conseguir formulaciones capaces de alcanzar de forma inalterada el colon, algunos autores han recurrido a formulaciones matriciales de pectina recubiertas con polímeros con solubilidad pH-dependiente que protejan la matriz de pectina durante su recorrido por la zona alta del digestivo (4). Así, Mura y colaboradores (23) desarrollaron comprimidos con diferentes pectinas recubiertos con Eudragit® S100 con el fin de conseguir una liberación colónica de teofilina. Para mejorar las características de compresión de la pectinas se prepararon mezclas físicas con Emdex® (dextratos hidrosolubles). Los resultados pusieron de manifiesto que en todos los casos el recubrimiento con Eudragit® S100 permite mantener inalterada la formulación durante las 4 primeras horas del ensayo (2 h a pH 1,1 y 2 h a pH 6,8) para posteriormente, en el medio con pH 7,4, y en presencia de enzimas pectinolíticas, liberar el 100% del fármaco en un tiempo máximo de 4 horas, no teniendo incidencia el tipo de pectina utilizada (amidada y de alto y bajo grado de metoxilación).

Das y colaboradores (24) obtuvieron cesión sostenida de resveratrol a partir de micropartículas de pectinato de zinc, observando que las concentraciones del catión zinc y el tiempo de reticulación condicionaban la fuerza del gel formado y su capacidad para controlar la cesión del fármaco vehiculizado. Por otro lado, se observó que la mejor condición de secado para estas formulaciones es en estufa a 37 °C, ya que el proceso de liofilización produce formulaciones porosas que liberan de forma rápida el resveratrol. Posteriormente, estos mismos autores estudiaron la interacción que se produce entre los grupos carboxílicos de la pectina (-) y los grupos amino del quitosano (+), con el fin de obtener un gel más resistente capaz de permitir la liberación del resveratrol en el colon. Los resultados mostraron que el pH de la solución reticulante, solución de acetato de zinc con quitosano, tiene gran influencia en la velocidad de liberación del fármaco, concluyéndose que

cuanto menor es el pH de la solución mejor es el proceso de reticulación. Así mismo, se encontró que la concentración de quitosano afecta directamente a la liberación del fármaco. Así, a mayor concentración de quitosano (1%) menor velocidad de liberación (< 8% de fármaco liberado después de 5 h de ensayo), siendo necesario un tiempo de reticulación de 120 min para formar una matriz suficientemente fuerte capaz de prevenir la liberación del fármaco en el fluido intestinal simulado, pero sensible a la liberación total del resveratrol en fluido colónico. Los resultados in vivo confirmaron las observaciones in vitro, demostrando que la interacción pectina/quitosano/zinc permite obtener la liberación de resveratrol en la región del colon (25).

La pectina también se ha utilizado para formular fármacos usados en la terapia del cáncer de colon, como el 5-fluorouracilo (5-FU). Así, Dev y colaboradores (26) han estudiado la capacidad que tienen las matrices de pectina recubiertas con Eudragit S 100 para liberar el 5-FU en el colon. Los resultados obtenidos mostraron que esta formulación presenta un período de latencia de 4 horas, tiempo suficiente para que el sistema libere el fármaco en la zona colónica. Así mismo, los estudios de citotoxicidad realizados con una línea celular de cáncer de colon humano (HT29) mostraron que la presencia de pectina en la formulación reduce significativamente la CTC50% (Concentración de Citotoxicidad en Células), lo cual potenciaría la actividad de esta formulación en comparación a una formulación sin pectina.

Con el fin de reducir los efectos adversos que puede producir la administración de fármacos en formas farmacéuticas convencionales para el tratamiento del síndrome de intestino irritable u otras enfermedades del colon, y aumentar su eficacia, Chaudhary y colaboradores (27) han desarrollado comprimidos de dicitolmina clorhidrato y diclofenaco potásico con un doble recubrimiento: una primera capa formada por acetato de celulosa y pectina, y una segunda capa, más externa, formada por Eudragit L-100, para conseguir liberación sostenida en el colon de ambos fármacos. La cubierta de Eudragit L-100 protege la fórmula hasta su llegada al intestino donde se disuelve, quedando únicamente la cubierta formada por acetato de celulosa y pectina. Al alcanzar el comprimido la zona colónica se disuelve la pectina de la cubierta por la acción de la flora bacteriana del colon y se crean poros a través de los cuales ceden ambos fármacos de acuerdo con una cinética de orden cero, durante un período de tiempo de 24 horas. La metodología descrita puede resultar interesante para fabricar comprimidos osmóticos microporosos que incluyan fármacos útiles en el tratamiento del síndrome de intestino irritable.

En los últimos años se han publicado diversos estudios que muestran las propiedades muco-adhesivas de la pectina, suscitando gran interés en varios equipos de investigación. Así Takeda y colaboradores (28) han desarrollado

formulaciones de comprimidos bioadhesivos de pectina reticulada con calcio para la liberación sostenida de lactoferrina (B-LF) en la cavidad oral, con el fin de tratar inflamaciones crónicas de la mucosa oral. Los resultados obtenidos demuestran que la pectina con alto grado de esterificación es la que presenta mayor fuerza de bioadhesión y un mejor control en la liberación de lactoferrina, lo cual también está condicionado por la concentración de agente reticulante. Posteriormente, Wattanakorn y colaboradores (29) desarrollaron comprimidos mucoadhesivos de liberación sostenida de carbenoxolona, para el tratamiento de úlceras de la cavidad bucal. Los resultados mostraron que la adición de lactosa a la formulación, producía una pérdida en la bioadhesividad de los comprimidos elaborados con pectina de alto grado de esterificación. Sin embargo, los comprimidos que fueron elaborados con pectina de bajo grado de esterificación no se vieron afectados. Otras investigaciones han mostrado que las macromoléculas de pectina pueden difundir a través de la mucosa nasal y así los geles de pectina pueden regular la absorción de los fármacos que incorporan (30, 31). Esta capacidad se encuentra directamente relacionada con la concentración y los grupos funcionales que posee la pectina utilizada en la formulación. Entre las ventajas que presentan las formulaciones con pectina para la administración de fármacos por vía nasal destacan: la permanencia de la formulación en la cavidad nasal, debido a la formación de enlaces de hidrógeno y enlaces de van der Waals entre la pectina y la mucina de la mucosa; la exclusión total de disolventes orgánicos durante el proceso de elaboración del sistema; y la fácil incorporación del fármaco mediante diversos métodos físicos como la difusión, el mezclado y la encapsulación o co-precipitación (32).

Una gran parte de los pacientes con cáncer padecen dolor que, en múltiples ocasiones, cursa con la aparición de picos, que la administración oral de sulfato de morfina en formulaciones de liberación inmediata no consigue atenuar hasta que han transcurrido 60 minutos desde su administración. Con el fin de mejorar esta situación se han desarrollado formulaciones de fentanilo (más liposoluble que la morfina) vehiculizado en aerosoles de pectina para su administración por vía nasal (FPNS). El ensayo clínico desarrollado en 110 pacientes con cáncer que sufrían estos picos de dolor puso de manifiesto la eficacia de esta formulación, pues 10 minutos después de la administración, la disminución del dolor era clínicamente significativa (33). Estos resultados, junto con la buena aceptación y tolerancia nasal por parte de los pacientes (34), han permitido que la EMEA apruebe la comercialización del citrato de fentanilo formulado con pectina en solución para pulverización nasal, y esta formulación se ha registrado con el nombre de PecFent (35).

3. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

En el año 1996 se publicó un trabajo en el que se ponía de manifiesto la actividad anticancerígena de una pectina modificada. La estructura ramificada de la pectina de cítricos se puede tratar y obtener así un compuesto de menor peso molecular rico en galactosa, que puede ayudar a retrasar la metástasis de las células cancerígenas porque se combina con sus grupos azúcares y bloquea las moléculas de lectina en la superficie de las células, que son las que favorecen la metástasis (36). Posteriormente Hayashi y colaboradores (37) estudiaron el efecto de la pectina de cítricos modificada (MCP) y un derivado de quercetina en la reducción del tamaño de tumores implantados en ratones. Los resultados mostraron que la administración diaria de ambos derivados naturales durante 20 días, producía una reducción en el tamaño de los tumores implantados, entre el 65% y el 70%, con una dosis de 1,6 mg/mL diarios. Este estudio fue el primero en evidenciar la actividad de MCP sobre el crecimiento de tumores primarios sólidos.

Existen en la bibliografía estudios que relacionan la aparición de cáncer de colon con la composición de la dieta en los que se asegura que una ingesta de fibra en la dieta diaria produciría un efecto protector frente al cáncer de colon. Así, se cree que la presencia de fibra en la dieta produciría una dilución del contenido de toxinas fecales, así como una disminución del tiempo de tránsito y un incremento en el peso de las heces, lo cual provocaría un descenso del riesgo de exposición que sufren las células del colon a potenciales mutágenos. Chen y colaboradores (38) realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* para comparar los efectos de la celulosa y de otras fibras de la dieta (pectina, glucomanano e inulina) frente a la citotoxicidad y el daño genético celular producidos en el cáncer de colon. Los resultados obtenidos mostraron que la pectina y la inulina ejercen un fuerte efecto protector frente a la cito y genotoxicidad del agua fecal, en células Caco2. Así mismo, la presencia de pectina en la dieta diaria produce un elevado incremento en los ácidos grasos de cadena corta, los cuales a su vez están relacionados con la protección de las células de colon humano frente al daño genético. También se observa una reducción en los niveles de ácido biliar secundario que serían los causantes del daño genético y del estrés oxidativo que sufren las células del colon. Estos resultados sugieren que fibras como la pectina pueden ser consideradas como agentes quimiopreventivos frente al cáncer de colon.

Entre los usos terapéuticos atribuidos a la pectina y a otras fibras de la dieta está su capacidad para reducir el colesterol. El mecanismo por el que las fibras solubles reducen el colesterol se debería a un descenso en la absorción de colesterol en el intestino. Para solubilizar y absorber el colesterol en el intestino es necesaria la presencia de ácidos biliares. Al producirse la unión de éstos a las fibras solubles, se reduce la cantidad de ácidos biliares libres y, por lo tanto, se reduce la absorción del colesterol en el intestino (39). Recientemente se ha estudiado el

efecto de la pectina, celulosa y cromo en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, mediante ensayos en ratas, y los resultados obtenidos sugirieron que un suplemento de pectina y cromo en la dieta podría ser beneficioso para corregir ciertos problemas en el metabolismo de lípidos (40). Así mismo, Marounek y colaboradores (41) investigaron la acción de la pectina y algunos derivados (pectina amidada) como reguladores del colesterol y del metabolismo en animales; los resultados obtenidos concluyen que tanto la pectina como la pectina amidada producen una reducción en el peso de los animales que recibieron esta dieta en comparación con el grupo control. Sin embargo, al analizar el efecto de este polisacárido y sus derivados sobre los niveles séricos de colesterol HDL, se observó que la pectina con alto grado de amidación produce un descenso significativo del colesterol total en suero. Se observó que las pectinas de alto y bajo grado de amidación reducen significativamente la concentración de colesterol hepático y las grasas. Estos resultados sugieren que las pectinas amidadas (hidrofóbicas) alteran de forma significativa la homeostasis del colesterol, por lo cual se les podría atribuir un efecto hipocolesterolémico. Con el fin de evaluar el efecto de las pectinas de alto grado de metoxilación (HM) sobre los factores de riesgo cardiometabólicos, Sánchez y colaboradores (42) realizaron estudios *in vivo* utilizando ratas Zucker, por ser el mejor modelo experimental de obesidad genética, ya que estos animales presentan alteraciones similares a las que aparecen en el síndrome metabólico humano. Los resultados obtenidos demuestran que una dieta enriquecida en pectina HM produce una reducción en la glucemia, insulinemia y en los lípidos del plasma, así como una pérdida de peso de los animales tratados con esta dieta en comparación con el grupo control. Así mismo, los autores sugieren que es necesario estudios en humanos para asegurar que la pectina HM reduce los factores de riesgo cardiometabólicos.

Por otro lado, la pectina ha demostrado ser un compuesto capaz de mejorar la estructura de la mucosa del intestino, prolongar el tránsito intestinal, y actuar frente a procesos diarreicos, debido a que incrementa la solidez de las heces y mejora la reabsorción de agua en el colon (43). Así, Rabbani y colaboradores (44) realizaron un estudio clínico para evaluar el efecto del plátano verde y la pectina sobre la permeabilidad intestinal y la pérdida de fluidos en 57 niños con diarrea persistente. Los resultados mostraron que la presencia de pectina o plátano verde en la dieta es capaz de revertir las anomalías en la permeabilidad de la mucosa intestinal ocasionada por la diarrea persistente, esta mejora en la permeabilidad de la mucosa originó un aumento en la consistencia de las heces, así como la reducción del peso de las mismas. El efecto antidiarreico de ambos tratamientos podría deberse a la producción de compuestos como butirato, acetato y propionato, los cuales estimulan la absorción de sales y agua en el colon.

En busca de otras aplicaciones terapéuticas se han evaluado las actividades anticoagulantes y antitrombóticas, así como el efecto de sangrado, de los derivados sulfatados de pectina cítrica, de alto y bajo peso molecular. Ambos polisacáridos presentan actividad anticoagulante “in vitro”, aunque el derivado de pectina de bajo peso molecular ha resultado ser “in vivo” un agente antitrombótico más potente, inhibiendo totalmente la trombosis venosa con una dosis de 3,5 mg/kg de peso. Sorprendentemente, en contraste con la heparina, ambos derivados de la pectina son capaces de inhibir directamente la α -trombina y el factor Xa por un mecanismo independiente de la antitrombina III y/o el co-factor II de la heparina. Además el derivado de alto peso molecular presenta menor riesgo de sangrado que la heparina a dosis que resultan 100% efectivas frente a la trombosis venosa (45).

Entre las diversas investigaciones destinadas a estudiar los efectos biológicos de la pectina, Wang y colaboradores (46) han realizado estudios in vitro para probar la actividad inmunológica de pectina extraída de Centella asiática. Los resultados obtenidos sugieren que los restos carboxílicos de las cadenas laterales de pectina son los responsables de su actividad inmunológica.

Así mismo, se ha atribuido a la pectina un cierto efecto protector frente a la intoxicación con metales pesados. Así, Kohn (47) estudió la posible interacción producida entre los cationes Sr^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y los grupos carboxílicos de diferentes fracciones de pectina.

Datos bibliográficos muestran que la administración de pectina en forma líquida podría mejorar los síntomas digestivos y respiratorios asociados al reflujo gastroesofágico (GER) que sufren los niños con parálisis cerebral. Así, Miyazawa y colaboradores (48) realizaron un estudio clínico en 18 niños con esta deficiencia neurológica para probar la eficacia de dos dietas, con diferentes concentraciones de pectina, sobre los síntomas causados por GER. Los resultados mostraron que el número de episodios de reflujo y vómitos por día, así como su duración, disminuyeron significativamente con la dieta que contenía mayor concentración de pectina, sugiriendo que la pectina líquida podría ser considerada como una terapia alternativa para el tratamiento de GER o como terapia adicional a la administración farmacológica. Estos resultados son prometedores ya que los fármacos convencionales son menos efectivos en este tipo de pacientes y en casos de síntomas persistentes se recurre a la cirugía antirreflujo, que a la vez presenta complicaciones y riesgos para el paciente

4. CONCLUSIONES

Todos los artículos recogidos en el presente trabajo de revisión demuestran ampliamente el gran potencial que tiene la pectina debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo coste como excipiente fundamental para modular la

liberación de fármacos, así como para conseguir la liberación específica de moléculas activas en la región del colon. Por otro lado, la modificación química de la pectina o su combinación con otros polímeros, produce hidrogeles que poseen excelentes cualidades para material biomédico o para conseguir la liberación de moléculas activas o células. Así también, éste polisacárido y sus derivados poseen características que permiten su aplicación terapéutica como coadyuvante en el tratamiento de diferentes patologías del digestivo, incluyendo entre ellas la diarrea persistente, el reflujo gastroesofágico y el cáncer de colon.

5. AGRADECIMIENTOS

Pseidy Luz Mamani Crispín, es beneficiaria de una beca predoctoral otorgada por el Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación (AECID) de España.

6. REFERENCIAS

1. May, C. D. (1990). Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. *Carbohydrate Polymers*, 12(1), 79-99.
2. Rolin, C. (1993). Pectin. In *Industrial gums* (3th Ed). New York: Academic Press.
3. Bourgeois, S., Gernet, M., Pradeau, D., Andremont, A., & Fattal, E. (2006). Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 324(1), 2-9.
4. Sinha, V. R., & Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1-2), 19-38.
5. Vandamme, T. F., Lenourry, A., Charrueau, C., & Chaumeil, J.C. (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48(3), 219-231.
6. Sharma, R., & Ahuja, M. (2011). Thiolated pectin: Synthesis, characterization and evaluation as a mucoadhesive polymer. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 658-663.
7. Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review, *Silpakorn University International Journal* 3, 206-228.
8. Di Lorenzo, C., Williams, C. M., Hajnal, F., & Valenzuela, J. E. (1988). Pectin delays gastric emptying and increase satiety in obese subjects. *Gastroenterology*, 95(5), 1211-1215.
9. FDA, Pectin on Generally Recognized as Safe (GRAS), Alphabetical List of SCOGS Substances. <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASSubstancesSCOGSDatabase/ucm084104.htm> (consultado en junio de 2011).
10. Kubo, W., Konno, Y., Miyazaki, S., & Attwood, D. (2004). In situ gelling pectin formulations for oral sustained delivery of paracetamol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30(6), 593-599.
11. Kubo, W., Miyazaki, S., Dairaku, M., Togashi, M., Mikami, R., & Attwood, D. (2004). Oral sustained delivery of ambroxol from in-situ gelling pectin formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1-2), 233-240.
12. Itoh, K., Yahaba, M., Takahashi, A., Tsuruya, R., Miyazaki, S., Dairaku, M., Togashi, M., Mikami, R., & Attwood, D. (2008). In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 95-101.

13. Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., & Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24(19), 3333-3343.
14. Mishra, R. K., Datt, M., & Banthia, A. K. (2008). Synthesis and characterization of pectin/PVP hydrogel membranes for drug delivery system. *AAPS PharmSciTech*, 9(2), 395-403.
15. Mishra, R. K., Datt, M., Pal, K., & Banthia, A. K. (2008). Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 19(6), 2275-2280.
16. Katav, T., Liu, L., Traitel, T., Goldbart, R., Wolfson, M., & Kost, J. (2008) Modified pectin-based carrier for gene delivery: cellular barriers in gene delivery course. *Journal of Controlled Release*, 130(2), 183-191.
17. Munarin, F., Guerreiro, S. G., Grellier, M. A., Tanzi, M. C., Barbosa, M. A., Petrini, P., & Granja, P. L. (2011). Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 12(3), 568-577.
18. Marti del Moral, A., Moreno-Aliaga, M.a J., & Martínez Hernández, A. (2003). Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutrición Hospitalaria*, XVIII (4), 181-188.
19. Rubinstein, A., Radai, R., Ezra, M., Pathak, S., & Rokem, J. S. (1993). In vitro evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharmaceutical Research*, 10(2), 258-263.
20. Ashford, M., Fell, J., Attwood, D., Sharma, H., & Woodhead, P. (1993). An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. *Journal of Controlled Release*, 26(3), 213-220.
21. Rubinstein, A., & Radai, R. (1995). In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(5), 291-295.
22. Wakerly, Z., Fell, J. T., Attwood, D., & Parkins, D. A. (1996). In vitro evaluation of pectin-based colonic drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 129(1-2), 73-77.
23. Mura, P., Maestrelli F., Cirri, M., González-Rodríguez, M. L., & Rabasco Alvarez, A. M. (2003). Development of Enteric-coated Pectin-based Matrix Tablets for Colonic Delivery of Theophylline. *Journal of Drug Targeting*, 11(6), 365-371.
24. Das, S., & Ng, K. Y. (2010). Colon-specific delivery of resveratrol: Optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 20-28.
25. Das, S., Chaudhury, A., & Ng, K. Y. (2011). Preparation and evaluation of zinc-pectin-chitosan composite particles for drug delivery to the colon: role of chitosan in modifying in vitro and in vivo drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 406(1-2), 11-20.
26. Dev, R. K., Bali, V., & Pathak, K. (2011). Novel microbially triggered colon specific delivery system of 5-Fluorouracil: Statistical optimization, in vitro, in vivo, cytotoxic and stability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1-2), 142-151.
27. Chaudhary, A., Tiwari, N., Jain, V., & Singh, R. (2011). Microporous bilayer osmotic tablet for colon-specific delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 134-140.
28. Takeda, C., Takahashi, Y., Seto, I., Kawano, G., Takayama, K., Onishi, H., & Machida, Y. (2007). Influence of pectins on preparation characteristics of lactoferrin bioadhesive tablets. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 55(8), 1164-1168.
29. Wattanakorn, N., Asavapichayont, P., Nunthanid, J., Limmatvapirat, S., Sungthongjeen, S., Chantasart, D., & Sriamornsak, P. (2010). Pectin-based bioadhesive delivery of carbenoxolone sodium for aphthous ulcers in oral cavity. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 743-751.
30. Liu, L. S., Fishman, M. L., Hicks, K. B. & Kende, M. (2005). Drug Delivery Systems from Pectin Formulations. *Pecifichem Conference*, #166970, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20.

31. Liu, L. S., Fishman, M. L. & Hicks, K.B. (2005). Pectin, a polysaccharide for drug delivery systems. 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, Hawaii, USA, December 19-22.
32. Liu, L. A., Fishman, M. L. & Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery - a review. *Cellulose*, 14(1), 15-24.
33. Fallon, M., Gatti, A., Davies, A., Lux, E. A., Kumar, K., & Galvez, R., (2010). Fentanyl pectin nasal spray provides clinically meaningful pain relief and a more rapid onset of analgesia compared with immediate-release morphine sulphate in breakthrough cancer pain. *Palliative Med*; 24:S24. Abstract.
34. Davies, A., Sitte, T., Elsner, F., Reale, C., Espinosa, J., Brooks, D., & Fallon, M. (2011). Consistency of efficacy, patient acceptability, and nasal tolerability of fentanyl pectin nasal spray compared with immediate-release morphine sulfate in breakthrough cancer pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, 41(2), 358-66.
35. EMEA, the European public assessment report (EPAR) for PecFent on European Medicines Agency [web site.](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001164/human_med_001387.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&jenabled=true)
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001164/human_med_001387.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&jenabled=true (consultado en junio de 2011).
36. Kidd, P. (1996). A New Approach to Metastatic Cancer Prevention: Modified Citrus Pectin (MCP), A Unique Pectin that Blocks Cell Surface Lectins. *Alternative Medicine Review*, 1(1), 4-10.
37. Hayashi, A., Gillen, A. C., & Lott, J. R. (2000). Effects of Daily Oral Administration of Quercetin Chalcone and Modified Citrus Pectin on Implanted Colon-25 Tumor Growth in Balb-c Mice. *Alternative Medicine Review*, 5(6), 546-552.
38. Chen, H. L., Lin, Y. M., & Wang, Y. C. (2010). Comparative Effects of Cellulose and Soluble Fibers (Pectin, Konjac Glucomannan, Inulin) on Fecal Water Toxicity toward Caco-2 Cells, Fecal Bacteria Enzymes, Bile Acid, and Short-Chain Fatty Acids. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 58(18), 10277-10281.
39. Deng, R. (2009). Food and Food Supplements with Hypocholesterolemic Effects. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1, 15-24.
40. Krzysika, M., Grajeta, H., Preschaa, A., & Weber, R. (2011). Effect of cellulose, pectin and chromium (III) on lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(2), 97-102.
41. Marounek, M., Volek, Z., Synytsya, A., & Copíková, J., (2007). Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 56(4), 433-442.
42. Sánchez, D., Muguerza, B., Moulay, L., Hernández, R., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2008). Highly methoxylated pectin improves insulin resistance and other cardiometabolic risk factors in Zucker fatty rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3574-3581.
43. Roth, J. A., Frankel, W. L., Zhang, W., Klurfeld, D. M., & Rombeau, J. L. (1995). Pectin improves colonic function in rat short bowel syndrome. *Journal of Surgical Research*, 58(2), 240-246.
44. Rabbani, G. H., Teka, T., Saha, S. K., Zaman, B., Majid, N., Khatun, M., Wahed, M. A., & Fuchs, G. J. (2004). Green banana and pectin improve small intestinal permeability and reduce fluid loss in Bangladeshi children with persistent diarrhea. *Digestive Diseases and Sciences* 49(3), 475-484.
45. Cipriani, T. R., Gracher, A. H., de Souza, L. M., Fonseca, R. J., Belmiro, C. L., Gorin, P. A., Sasaki, G. L., & Iacomini, M. (2009). Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(5), 860-866.
46. Wang, X. S., Liu, L., & Fang, J. N. (2005). Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. *Carbohydrate Polymers*. 60(1), 95-101.

47. Kohn, R., (1982). Binding of toxic cations to pectin, its oligomeric fragments and plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, 2, 273-275.
48. Miyazawa, R., Tomomasa, T., Kaneko, H., Arakawa, H., Shimizu, N., & Morikawa, A. (2008). Effects of pectin liquid on gastroesophageal reflux disease in children with cerebral palsy. *BMC Gastroenterology*, 16, 8-11.

Guillermo Folch Jou, maestro de Historia de la Farmacia española

Francisco Javier Puerto Sarmiento

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Recibido el 6 de julio de 2011.

e-mail: edicion@ranf.com

RESUMEN

Se hace un estudio de la figura de Guillermo Folch Jou, catedrático de Historia de la Farmacia de la Universidad Complutense y académico de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Palabras clave: Guillermo Folch Jou; Biografía; Historia; Académico.

ABSTRACT

Guillermo Folch Jou: A magister biography

A study of the figure of Guillermo Folch Jou, Professor of History of the Pharmacy from the Complutense University and academican of the Royal National Academy of Pharmacy is realized.

Key words: Guillermo Folch Jou; Biography; History; Academician.

1. INTRODUCCIÓN

La Real Academia Nacional de Farmacia no tiene, entre las importantes misiones contempladas en la legislación vigente, la de conservar su propia memoria institucional, ni la de sus componentes.

Sin embargo, la Historia de la Ciencia, en cierta manera, nació a partir de las oraciones fúnebres redactadas en la Academia de Ciencias francesa, ante la desaparición de sus componentes.

En la Nacional de Farmacia no sólo se celebran sesiones necrológicas cuando fallece alguno de sus miembros, sino que está institucionalizada, desde su fundación, la sección de Historia, a la cual, tal vez, deberían competelerle estas misiones.

Las oraciones fúnebres de la Academia francesa o las sesiones necrológicas de la nuestra no suelen ser excesivamente útiles, para el historiador, por el lógico matiz panegírico de las mismas y la ausencia de cualquier estructura metodológica las más de las veces, además de la falta de su inserción en el ambiente histórico de la sociedad y la ciencia de la época.

Por eso, ahora que la Academia está tan bien dotada de historiadores, tanto entre sus miembros de número como correspondientes, me parece obligatorio emprender esta tarea. La comienzo con una biografía de mi maestro, con lo cual incurro en varios de los pecados antes denunciados: la última parte de la biografía no es objetiva, sino afectiva, aunque la obligación del historiador –cree uno– no es tanto la objetividad como la honradez; al declarar mi parcialidad hacia el biografiado cumplo con la obligación impuesta por la segunda de las principales características que debe cumplir quien a este oficio se dedique. Seguramente la de la parcialidad institucional será una característica de cuantas intentonas biográficas hagamos los académicos, al hablar de quienes antes lo fueron, aunque siempre trataremos de entibiarla mediante la objetividad.

2. GUILLERMO FOLCH JOU: LOS ORÍGENES

Nació en Madrid, el 19 de marzo de 1917 y murió en la misma ciudad el 3 de enero de 1987.

Fue hijo del catedrático Rafael Folch Andreu. Su padre pertenecía a una familia modesta de Montblanch (Tarragona). Estudió la segunda enseñanza en el Instituto de Tarragona y la carrera de farmacia en la universidad de Barcelona, simultaneándola con su trabajo de practicante de la farmacia de la Casa Provincial de Caridad. Tras la licenciatura, con sobresaliente y premio extraordinario, (1903) alcanzó el grado de doctor en la Universidad Central con idénticas calificaciones (1904). En Barcelona se le había nombrado Auxiliar interino de la Facultad de Farmacia (1903). Ejerció la profesión al frente de una botica en Masnou (Barcelona) (1908-1911). En 1911 regresó a Madrid y un año después obtuvo el puesto de Auxiliar numerario de la Facultad de Farmacia. En 1914 fue designado preparador químico de la Estación Agronómica del Instituto Agrícola Alfonso XII y al año siguiente ganó la oposición a la cátedra de Historia de la Farmacia y Estudio Comparativo de las Farmacopeas Vigentes, correspondiente al periodo del doctorado. Así se convirtió en el primer catedrático, profesional de la materia, en la Facultad de Farmacia madrileña (1).

De manera evidente, la profesión del padre influyó en el hijo, quien también fue farmacéutico y catedrático de Historia de la Farmacia.

En el terreno más íntimo, conservó siempre la lengua catalana y el amor hacia la tierra paterna. Allí, en 1981 presidió la celebración de un homenaje bilingüe a su memoria.

3. FORMACIÓN

Guillermo Folch estudió el Bachillerato en el Instituto del Cardenal Cisneros de Madrid. Se licenció (1941) y doctoró (1942) (2) en Farmacia, en la Universidad Complutense de Madrid, con premio extraordinario en ambos grados.

El año 1942 fue nombrado profesor auxiliar de la cátedra de Historia de la Farmacia y Estudio comparado de las Farmacopeas (3).

4. ACTIVIDADES PROFESIONALES EN LA ADMINISTRACIÓN

En el mismo año obtuvo el puesto de becario por oposición en el Laboratorio Municipal de Madrid, en donde permaneció durante dos años.

En 1944 ingresó por oposición en la Dirección General de Sanidad. Permaneció allí hasta 1958. Dentro de la Inspección General de Farmacia, como inspector regional, organizó el control e inspección de la industria farmacéutica española. Efectuó visitas de inspección en toda España; de manera más constante en Madrid, Barcelona, Valencia y Málaga. Fue el encargado de redactar las normas protocolarias para las visitas de inspección. También se encargó de organizarlas para efectuarlas de manera seriada y permanente a todos los laboratorios productores de especialidades, con recogida de muestras y control de las mismas (4).

De forma ocasional se le encargó el control de estupefacientes en toda la nación, de ahí su magnífica relación con el Cuerpo de Policía Nacional, en cuya escuela solía dar una conferencia cada año.

5. ACTIVIDADES PROFESIONALES EN LA INDUSTRIA

En la documentación relativa al encuadramiento del Sindicato Vertical de Industrias Químicas, aparece el 6 de febrero de 1943 el Laboratorio Promesa (Productos Medicinales, S.A.)

Tenía el centro de producción en la calle Arturo Soria, 147 de Madrid y las oficinas en Alcalá 30. Se fundó en 1940, o acaso 1942, como una concesionaria de procedimientos de la empresa CHINOIN, situada en Ujpest (Hungría). El gerente era Antonio de Vargas-Machuca y la Directora Técnica, Petra de Prada.

Ese laboratorio fue adquirido en 1968 por Guillermo Folch. Su nombre se modificó a Productos Medicinales S.A. "PROMESA". Además de su centro de

fabricación de Arturo Soria, se abrió otro en Barcelona (Vía Layetana, 159) (5). La empresa tenía un censo obrero de veintisiete personas: dieciocho hombres y nueve mujeres; de ellos nueve técnicos, siete administrativos y once dedicados a los procesos productivos.

A este pequeño laboratorio dedicó Guillermo Folch buena parte de su vida, de su actividad profesional, y mediante el mismo labró su fortuna económica. Aparte del esfuerzo personal que supondría para una persona sin otra familia que su esposa, hermanos y sobrinos, cabe destacar la propaganda efectuada para las especialidades del laboratorio, en donde empleó sus conocimientos históricos, su afición a la cerámica farmacéutica y su interés en la pintura.

A partir de esa actividad empresarial, formó parte de la Junta Directiva de Farmaindustria, la patronal del sector.

En 1968 fue elegido Presidente del Consejo General de Colegios Farmacéuticos de España, aunque permaneció muy poco tiempo en el cargo, sin duda imposibilitado por el cúmulo de ocupaciones; sin embargo fue Presidente de su Comisión Asesora Científica desde 1970.

También fue vocal de la Comisión científica del Instituto Nacional de Previsión para la vigilancia del concierto con la industria farmacéutica, con lo cual siempre anduvo entre la administración sanitaria, la vigilancia de las buenas prácticas industriales, la enseñanza y el empresariado.

6. ACTIVIDADES UNIVERSITARIAS

El 28 de enero de 1954 fue nombrado catedrático de Historia de la Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, tras la correspondiente oposición (6) , y se le confirmó como director del Museo de la Farmacia Hispana, cuyo trabajo venía ejerciendo desde 1951.

En la Facultad de Farmacia fue Secretario de actas desde 1948 hasta 1952 y Secretario de la Facultad desde 1951 hasta 1952 y desde 1958 hasta 1961 (7).

Siempre fue el director del entonces Departamento de Historia de la Farmacia.

7. ACTIVIDADES INTELECTUALES

En el ámbito científico se dedicó, con entusiasmo, acierto y profundidad, a continuar con la obra intelectual de su padre y a modernizarla metodológicamente. Como él, escribió textos generales sobre la disciplina.

En el prólogo a la primera edición de su libro sobre Historia de la Farmacia (8), Rafael Folch indica que es un texto de divulgación y él mismo escribe que no

puede considerarse como obra de consulta para eruditos. Acompañó a la edición de 1951 de un gran número de citas y abundante bibliografía, para cubrir las únicas deficiencias que pudieran atribuirse al libro paterno. Lamentablemente en ediciones posteriores se suprimió el aparato bibliográfico (9). La sencillez del texto le hizo muy útil para la docencia y tremendamente popular a nivel internacional. Se hizo cargo de lo referente a España en el texto de Kremers y Urdang (10) y, al final de su vida, trató de plasmar todas sus hipótesis de investigación en un gran texto en el que intervinieron también José María Suñé, José Luis Valverde, la mayoría de los profesores de la materia de España y yo mismo como secretario de redacción (11). Lamentablemente no llegó a poder corregir las pruebas de imprenta. La muerte se lo impidió.

Se ocupó también de la historia del medicamento en general (12), dirigió un trabajo sobre medicamentos romanos (13); escribió otro sobre los empleados por los árabes (14); se interesó en las drogas americanas (15), en la influencia de la botánica en la materia farmacéutica durante el siglo XVI (16), se ocupó de la terapéutica farmacológica durante el siglo XVII (17). En las últimas investigaciones citadas trató de aplicar una metodología econométrica implicada en la historia social, que impuso también en muchas de las tesis y tesis dirigidas por él y sus colaboradores, en un estupendo intento de rejuvenecer la metodología de investigación en la disciplina.

También dirigió una Tesis sobre la aparición de las especialidades farmacéuticas (18). Le interesó el análisis histórico de la alimentación (19), se ocupó en extenso de las corporaciones farmacéuticas españolas (20), de las instituciones farmacéuticas y de enseñanza de la Farmacia (21).

Dirigió innumerables tesis, se implicó muchísimo en las mismas, y entre sus alumnos nos contamos cuantos ahora nos dedicamos a estos menesteres en la Universidad Complutense.

La tesis de José de la Vega Portilla (22) inauguró una vía de estudios sobre la Real Botica que luego continuó María Esther Alegre (23), también dirigida por Guillermo Folch y más tarde varios discípulos de esta última. A Sagrario Muñoz (24) le dirigió su tesis sobre la influencia de la Inquisición en la ciencia moderna, tema sobre el que él mismo incidió (25) y a mí sobre alquimia (26). Angustias Sánchez Moscoso redactó su Tesis doctoral sobre José Rodríguez Carracido bajo su dirección (27) y luego fue Profesora Titular en la Facultad de Farmacia de Alcalá de Henares y antes había dirigido a la Dra. Pilar Hinojo (28), quien luego fue catedrático en la misma Facultad de Farmacia de Madrid. Una discípula de ella, la Dra. Rosa Basante, también llegó a Profesora Titular de Historia de la Farmacia y consideró siempre a Guillermo Folch como su maestro.

El estudio de la Farmacia en Navarra con Pilar Herrero, lo amplió a Portugal, con la misma investigadora (29) y se ocupó de la Farmacia en Zaragoza (30). Le interesó también la relación entre el arte el oficio de la Farmacia y las oficinas de Farmacia españolas (31).

En el ámbito de las fuentes para la Historia de la Farmacia, dirigió una muy útil catalogación de los manuscritos relacionados con la Historia de la Farmacia de la Biblioteca Nacional (32) y otra catalogación de los libros raros, relacionados también con la Farmacia de la misma biblioteca (33). En esa misma línea, además del catálogo del Archivo de la Real Academia Nacional de Farmacia, al que me referiré más adelante, se ocupó del catálogo de los documentos del Archivo del antiguo Departamento de Historia de la Farmacia (34).

En el terreno de la biografía destacaría sus trabajos sobre Andrés Laguna (35) y el trabajo dirigido sobre la vida y obra de Pedro Gutiérrez Bueno (36).

En lo referente a la relación entre literatura y ciencias de la salud, dirigió otra Tesis doctoral sobre las novelas de Benito Pérez Galdós (37).

Por si no se considerase suficiente su labor, efectuó una importante tarea divulgadora en revistas como Farmacia Nueva de Madrid, Circular Farmacéutica de Barcelona, Boletín de Información del Consejo General de Colegios de Farmacéuticos de España, Galénica Acta, Acofar, Medicamenta, y El Monitor de la Farmacia y de la Terapéutica.

De su amplísima actividad en la Academia Internacional de Historia de la Farmacia quedan sus publicaciones en el Boletín de la Oficina sanitaria Panamericana, los Anais da Faculdade de Farmacia do Porto, el The British & Overseas Pharmacist, la Internationale Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie, el Veroffentlichungen der Internationalen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie o las Atti e Memorie Dell'Accademia Italiana di Storia della Farmacia, en donde no publicó sus mejores trabajos, sino aportaciones muy puntuales pero que, junto a sus obras en castellano, le produjeron un gran renombre internacional.

8. GUILLERMO FOLCH, MUSEÓLOGO

Lo más original y querido de su obra se encuentra en el ámbito de la museología, científica y farmacéutica, no sólo por sus trabajos sino también por la manera en que consiguió poner en marcha uno de los mejores museos de Farmacia del mundo, sin personal ni presupuesto, sólo superado por el de Heidelberg, que goza de local propio, personal y una fuerte dotación económica.

Como vimos, en 1915 Rafael Folch Andreu ganó por oposición la primera cátedra de Historia de la Farmacia implantada en la universidad española. Muy posiblemente desde entonces pensó en organizar un museo, movido por el afán

coleccionista que el positivismo alentó entre los historiadores de las diferentes ramas científicas. Hasta 1923 no fue nombrado Secretario de la Facultad de Farmacia y en esa misma fecha, en los armarios acristalados de la Secretaría, de la Sala de Juntas y en las boardillas del edificio que hoy ocupa la Real Academia Nacional de Farmacia, comenzó a guardar cuantos instrumentos inservibles eran desechados por los laboratorios del centro. Así pudieron conservarse piezas tan irremplazables como los utensilios de vidrio procedentes del viejo laboratorio de química del Colegio de Boticarios de Madrid, algunos de ellos heredados seguramente por Andrés Alcón (1782-1850) del laboratorio de Luis José Proust (1754-1826) de la calle del Turco, alguno de sus crisoles de platino, parte del instrumental del Colegio de Farmacia de San Fernando –el primer centro en impartirse enseñanza farmacéutica oficial (1815), después del Real Jardín Botánico madrileño (1780)- o la placa del herbario del Colegio de Farmacia de Santiago de Compostela objetos, todos ellos, de valor intelectual y material incalculable.

Poco tiempo después entró como Profesor Auxiliar suyo Rafael Roldán Guerrero (1888-1965) y ambos se empeñaron en la obra de implantar museos de Farmacia en España. Roldán era farmacéutico militar, en cuyo cuerpo llegó a General, y logró convencer a las autoridades para montar un excelente museo en los locales anejos al Parque de Farmacia militar. Hoy en día mejorado, modernizado y magnífico.

Rafael Folch, visitante asiduo del Rastro madrileño, se hizo con una colección magnífica de cerámica farmacéutica. Logró la donación o la compra de varios conjuntos excelentes. Entre ellos un botamen de cerámica catalana con influencia francesa, del siglo XVIII, adquirido al farmacéutico Ferrer de Puigcerdá (Girona), que se conserva en las anaqueleras de la también catalana farmacia Gibert.

La de Gibert, antigua botica de Torredembarra (Tarragona) fue la primera farmacia importante que logró adquirir en 1948, mediante una donación de la Junta de Facultad de Farmacia de Madrid, con motivo del Primer Congreso Hispano-Portugués de Farmacia.

En el año 1929, el farmacéutico Aurelio Gamir (1878-ca.1942) financió la reproducción de la farmacia del Hospital Tavera de Toledo, para ser expuesta en la Exposición Hispano-Americana de Sevilla. Una vez finalizada la muestra en 1930, la cedió al museo de la Facultad, aunque hubo de guardarse en los desvanes por falta de espacio.

Pese a no poderlo instalar, Rafael Folch siguió con su hábito coleccionista, animado por el viaje efectuado en 1934 al museo de Historia de la Farmacia de Basilea y al aliento de su fundador, el profesor de Historia de la Farmacia, Joseph Anton Häfliger (1873-1954).

Cuando se inicia la construcción de la Ciudad Universitaria (1927) bajo el patrocinio de Alfonso XIII (1886-1941), Rafael Folch Andreu fue nombrado vocal de la Junta Constructora y logró incluir en los planos de la futura Facultad, una zona para los museos de Farmacognosia, Ciencias Naturales e Historia de la Farmacia.

La contienda civil de 1936-1939, no sólo paralizó las obras, sino que convirtió a la ciudad universitaria en descarnado frente de batalla en la lucha por Madrid. Acabada la fratricida contienda se reconstruyó el campus y, en 1944 se trasladó la Facultad de Farmacia a su emplazamiento actual. Los museos proyectados no se llevaron a la práctica, excepto el de Historia para el cual se cedieron, no sin grandes dificultades, unos locales de 25 por 15 metros.

La visita en los años cincuenta de Cayetano Alcázar (+1958) catedrático de Historia de España Moderna y Director General de Enseñanza Universitaria, hizo realidad la primera subvención mediante la cual el arquitecto Garriges montó el laboratorio alquimista con iconografía proporcionada por Guillermo Folch Jou.

Fue Guillermo Folch el primer director en 1951, cuando era Profesor Auxiliar de Historia. Tras la jubilación de su padre, pasó a encargado de cátedra y siguió en el puesto hasta su fallecimiento, ayudado siempre, de manera incondicional, por Pilar Herrero Hinojo.

La capacidad para poner en marcha un museo francamente bueno, le hizo ser admirado tanto en España como en el resto del mundo. No satisfecho con el haber materializado la ilusión paterna, estudió la historia del propio Museo, su cerámica y sus morteros (38, 39).

A su fallecimiento sin hijos, legó al Museo una importante colección de cerámica farmacéutica, el Legado Folch, formada por treinta y nueve piezas que van desde un albarello de Manises de mediados del siglo XV, uno de Aragón de la segunda mitad del XVI o principios del XVII y varios catalanes y talaveranos del XVIII, además de cinco morteros de bronce, valorados en unos cuarenta mil euros, en su momento. También donó su biblioteca privada científica, formada por unos cuantos centenares de textos muy especializados y algunos de gran valor.

Además estableció, con una parte de su fortuna inmobiliaria, la Fundación Rafael Folch, dedicada a perpetuar el nombre familiar. Gracias a la misma el Museo de Farmacia Hispana ha podido ser socorrido, por el Decanato de la Facultad, cuando ha necesitado efectuar alguna adquisición, ya que carece de presupuesto ordinario y además se han concedido muchas becas para efectuar los estudios de doctorado en Historia de la Farmacia y en otras disciplinas de la Facultad, bien dotadas durante tres anualidades.

9. PRESIDENTE DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA DE LA FARMACIA

La Sociedad Española de Historia de la Farmacia y su Boletín fueron fundados gracias al tesón y al entusiasmo de Rafael Roldán, secundado en este caso por Rafael Folch Andreu, aunque ambos se implicaron muchísimo en el proyecto. Tras el fallecimiento de ambos, en marzo de 1966 Guillermo Folch fue elegido presidente de la Asociación y de su órgano de expresión científica.

Con enorme entusiasmo aglutinó a un grupo numeroso de farmacéuticos españoles y de instituciones farmacéuticas en torno a la Historia de la Farmacia. Él fue el alma de la sociedad y del Boletín, con la ayuda de cuantos colaboramos con él a lo largo del tiempo.

A su muerte no hemos sabido mantener ese legado. La división autonómica de España hizo complicada la supervivencia de una Sociedad adjetivada como española –en la actualidad sólo existe la Sociedad catalana de Historia de la Farmacia- además el Boletín se convirtió en centro de conflicto en las confrontaciones universitarias, ocasionadas siempre por el intento de perpetuarse en los puestos académicos mediante las oposiciones y así, algo que había sido creado para la profesión farmacéutica se transformó en un mecanismo de conflicto ni siquiera intelectual, meramente funcional.

Sería el momento, creo yo, de volver a hacer renacer la Sociedad de Historia de la Farmacia, pero la dificultad estriba en aunar o disociar definitivamente la visión inicial de farmacéuticos amantes de la historia de su profesión o intelectuales o científicos deseosos de dar a conocer su ciencia con todos los requerimientos científicos imprescindibles. Actualmente no parece tan difícil, si hubiera interés, ya que la mayoría de los docentes de Historia de la Farmacia se aúnan en la Sociedad Española de Docentes Universitarios de Historia de la Farmacia, tienen sus propias reuniones y podrían organizar sus mecanismos de difusión científica.

10. AUTOR DE TEXTOS SOBRE LEGISLACIÓN Y DEONTOLOGÍA

Guillermo Folch fue un museólogo y un historiador, pero se sintió fundamentalmente farmacéutico y, como hemos visto, participó en la profesión desde múltiples ámbitos.

Cuando se igualaron legalmente las materias Historia de la Farmacia y la Legislación farmacéutica, de una manera surrealista, como suele suceder con la legislación española no sólo universitaria, aunque a regañadientes, Guillermo Folch comenzó a impartir clases de Legislación farmacéutica.

No hay cosa más árida que la legislación de lo que sea. No me refiero al Derecho, si no a la legislación; la repetición de Leyes, Decretos, órdenes y demás

zarandajas, no estaba hecha para Guillermo Folch, por eso inundaba sus clases de opiniones personales y de deontología profesional. Él hablaba de cómo se organizaba la profesión e, inmediatamente, de cómo pensaba debía organizarse en realidad. Por eso se interesó tanto en la deontología farmacéutica y llegó a ser en este ámbito también un tratadista respetado (40).

11. MIEMBRO DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA Y DE OTRAS INSTITUCIONES CIENTÍFICAS

La excelencia de su labor investigadora se reconoció con dos premios de la Real Academia Nacional de Farmacia (41), a la que perteneció como miembro de número desde el año 1969 (42) y en donde destaca su labor en la catalogación de los fondos de su archivo (43) y diversos trabajos, ya citados, sobre la implicación de su institución antecesora, el Colegio de Boticarios de Madrid, en el análisis de medicamentos o en la enseñanza farmacéutica. Pronunció el discurso de apertura del curso 1971-1972 (44) y colaboró de forma muy dinámica en sus sesiones y en los Anales.

También fue miembro de la Academia Internacional de Historia de la Farmacia; la presidió durante cinco años (1969-1974).

Fue académico correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Barcelona; miembro correspondiente de la Sociedad de Historia de la Farmacia de Francia; Socio de Honor de la Academia de Historia de la Farmacia del Perú; miembro de honor de la Academia de Historia de la Farmacia del Brasil; colegiado de honor del Nobili Collegio Químico-Farmacéutico de Roma; miembro de la Academia de Historia de la Farmacia Italiana; miembro de honor de la Associazione Italiana di Storia Della Farmacia; miembro de honor del Círculo Benelux de Historia de la Farmacia.

12. PREMIOS Y DISTINCIONES

Obtuvo el Premio Conci, del Colegio de Farmacéuticos de Roma, el Lauro Palatino de la Academia Italiana di Storia Della Farmacia, la medalla Schelenz para historiadores de la Farmacia y la medalla Urdang otorgada por el Instituto Americano para la Historia de la Farmacia.

13. LA VISIÓN SUBJETIVA

Guillermo Folch fue mi maestro y a los maestros, como a los padres o se les quiere o se les destrona. El mío es el primer caso.

Don Guillermo era un hombre enjuto, no demasiado alto, con gafas, grandes y sarmentosas manos y un carácter nervioso e impaciente que, a veces, le hacía desbarrar en ataques de ira de intensidad variable, aunque de escaso recorrido. Jamás hizo de sus enfados con amigos, colaboradores o alumnos cuestión de rencor. Estallaba y recobraba la calma con la misma facilidad de una tormenta veraniega. Cuando le conocí estaba enferma su primera mujer, Carmina, y tras su muerte se casó con María José Rodríguez Velasco, su actual viuda. No tuvo descendencia.

A Folch Jou le gustaba y disfrutaba de la vida.

Era aficionado a la comida buena aunque su austeridad vital le impedía la glotonería. Bebía moderadamente pero no perdonaba su güisqui con almendras saladas de la tarde y fumaba de manera absolutamente immoderada, más aún que quien esto escribe, todo lo que cayera en sus manos y pudiera ser convertido en humo, aunque siempre tabaco: pitillos, puros o pipa. Le gustaban y podía permitirse los coches buenos y rápidos –aunque se creía mejor conductor de lo que era- los barcos grandes, desde donde pescaba y se relajaba todos los veranos en Marbella primero y en Jávea después y los perros pequeños. Le entretenía (poco) el golf y mucho la pintura (45), la literatura y, sobre todo, la fotografía. Según pude deducir, las relaciones con su padre no fueron excesivamente templadas, lo cual, probablemente le impulsó a demostrar y demostrarse su valía, no sólo en el ámbito académico, también en el administrativo y empresarial. Al final no sólo le hizo un gran homenaje con exposición de la totalidad de su obra escrita, en el cual colaboré muy activamente, sino que instauró la medalla Rafael Folch, para premiar a los historiadores de la Farmacia destacados y, como he señalado la Fundación Rafael Folch. La reconciliación con su figura fue total y hermosísima. Cuando yo le conocí había menguado mucho su actividad empresarial, que cesó al poco tiempo, y tenía una dedicación exhaustiva al Museo y a la investigación histórica. En el Departamento había establecido la costumbre del café diario, en donde se hablaba de todo, también de Historia y tenía una especial devoción a su Museo, a su Real Academia y a un grupo de amigos reunidos en la llamada peña de los veinte, que todavía seguimos reuniéndonos (yo entré mucho después de su fallecimiento).

Se presentaba ante los demás –si tenían el suficiente grado de intimidación- como un luchador y un hombre hecho a sí mismo. De manera vaga, entreví que lo pasó muy mal durante la Guerra Civil, estuvo a punto de morir por una disentería sangrante y algo debió ayudarle –como a tantos otros- la CNT a quien siempre le guardó profundo afecto. En algún momento se declaró anarquista ante la estupefacción y el jolgorio –porqué no escribirlo- de los alumnos que no podían entrever en un hombre escrupulosamente bien vestido, con un traje y una corbata diferente cada día, a uno de los anarquistas perseguidos por el Régimen. Sin embargo algo de libérrimo había en ese hombre capaz de la tolerancia durante el

franquismo y de asimilar cuantas novedades metodológicas se le proponían, sin excesivas reticencias. Respetaba el trabajo y la inteligencia intelectual y esa actitud no resultaba frecuente en la universidad franquista. Tenía especial predilección por el trabajo de su padre, de Pedro Laín y de José María López Piñero. Predilecciones heredadas por quien esto escribe y a las que he añadido algunas otras. También era católico, aunque ni mucho menos beato y trataba de afrontar la vida –y la muerte- con la entereza de un hombre cabal. Poco antes de su última operación, cuando yo ya era catedrático, me espetó: ya ves Javier. Esta tarde me operan. Si sale con barbas San Antón y si no la Purísima Concepción. Fue que no.

Creo que se alegró con mi oposición, en la cual me ayudó cuanto le fue posible pues nunca había olvidado la suya y consideraba imprescindible la continuación de la Historia en la Facultad de Farmacia. A ese respecto me obligó a ocupar su despacho, antes de su padre, y me regaló la medalla de catedrático que había usado Rafael Folch y él mismo, la que ahora luzco cuando, de tanto en tanto, me veo obligado a vestir traje académico.

A Guillermo Folch le obligaron a jubilarse antes de tiempo, cuando cumplió los sesenta y cinco años. En el Departamento de Historia, ya transformado en una unidad del Departamento de Farmacia y Tecnología, hubiésemos querido que se quedara como emérito o, si eso no fuera posible –al principio no lo fue- como director del Museo. La muerte se lo impidió y herido de muerte fue a Barcelona a una tesis a despedirse de sus amigos y asistió a mi durísima oposición. Su única falta, pienso yo ahora, fue morir demasiado pronto y lo pienso de manera interesada. Era yo, éramos entonces, demasiado jóvenes y sin su presencia se fue al garete la Sociedad Española de Historia de la Farmacia y costó mucho modernizar el Museo y seguir con las actividades en la Real Academia. Con él las cosas hubieran sido más fáciles. Aún ahora, algunos profesores le añoramos (46).

14. REFERENCIAS Y NOTAS DEL AUTOR

1. Rafael Roldán Guerrero, *Diccionario Biográfico y Bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*, Madrid: imprenta del P.H.O.E, 1975, T. II, pág. 237-249 y varios trabajos en Guillermo Folch Jou y Javier Puerto (coord.) *Medicamento, Historia y Sociedad*, Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 1982.
2. Guillermo Folch Jou, *El té y su infusión: tesis doctoral*, Madrid: Universidad Central, Facultad de Farmacia, 1942 (Tesis inédita).
3. El 26 de octubre de 1942 se le nombró para cubrir la vacante producida por el cese en el mismo puesto de D. Rafael Roldán Guerrero (Archivo de la Universidad Complutense, AUC.).
4. Fruto de este trabajo serían sus publicaciones: Nazario Díaz López; Guillermo Folch Jou, Francisco de P. Sala, *Manera de organizar los aprovisionamientos sanitarios*, Ponencia presentada en la II reunión nacional de sanitarios españoles, Madrid: Imprenta Sáez, 1947; Guillermo Folch, *El análisis del cacao español*, Bilbao: Sindicato Vertical de Industrial Químicas, 1946; Guillermo Folch,

Estudio de las características analíticas de las sales amónicas de los derivados sulfonados de hidrocarburos, conocidos con el nombre de sulfotumenólidos, sulfotiólicos, tiosulfónicos, etc, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 1944, 6, pág. 835-865; Nazario Díaz López; Guillermo Folch Jou, *Guía para el farmacéutico con oficina de Farmacia*, Madrid: Dirección General de Sanidad. Inspección General de Farmacia, 1957 y más tardíamente, Guillermo Folch Jou, María Asunción Ruiz González-Miranda, *Labor sanitaria farmacéutica: ponencia presentada a las I jornadas Farmacéuticas Hispano-Argentinas*, Madrid: {s.n.} 1971.

5. *Archivo General de la Administración. Sindicatos. Encuadramientos de laboratorios farmacéuticos*. Esta información me ha sido cedida generosamente por el Prof. Dr. Raúl Rodríguez Nozal a quien manifiesto mi agradecimiento.

6. Su primera lección versó sobre *Los farmacéuticos en la química: primera lección de...*Madrid: Inspección General de Farmacia, 1954. El 20 de septiembre pronunció la conferencia de apertura de la Asamblea de la Academia Internacional de Historia de la Farmacia, celebrada en Roma. AUCM.

7. Renunció el 20 de abril de 1961 (AUCM).

8. Guillermo Folch Jou, prólogo de Rafael Folch Andreu, *Historia de la Farmacia*, Madrid: Afrodisio Aguado, 1951.

9. Guillermo Folch Jou, *Historia de la Farmacia*, Madrid: Patronato de Huérfanos de Oficiales del Ejército, 1957 y Madrid: Gráficas Alonso, 1972.

10. Edgard Kremers and Georde Urdang, *History of pharmacy: a guide and survey*, Philadelphia: J.B. Lippincott, 1951.

11. Guillermo Folch Jou, José María Suñé, José Luis Valverde, Javier Puerto, *Historia General de la Farmacia: el medicamento a través del tiempo*, Madrid: ed. Sol, 1986.

12. Guillermo Folch Jou, Javier Puerto, El Farmacéutico en la Historia y en la Sociedad. En *Historia del Medicamento*. (Dirigido por Diego Gracia y Guillermo Folch). Ed.Doyma S.A. Barcelona 1984. p. 201-217. y Ciencia y arte de la Farmacia. En *Historia del Medicamento* (Dirigido por Diego Gracia y Guillermo Folch). Ed. Doyma S.A. Barcelona 1984. p. 219-235.

13. Juan Castillo Orugas, *Los colirios con óxido de cin: su historia, fundamento y relato de las fórmulas más notables* Madrid: Universidad Complutense (Tesis doctoral inédita), 1963 dirigida por Guillermo Folch Jou.

14. Guillermo Folch Jou, Medicamentos empleados por los árabes y su posible influencia en la introducción de la química en la Farmacia, *Asclepio*, 1978-79, vol. 30-31, pág. 177-186

15. Guillermo Folch Jou, Pilar Herrero Hinojo, Contribución de los españoles al conocimiento y divulgación de la materia médica americana, *Asclepio*, 1957, vol. 9, pág. 173-181, Guillermo Folch Jou, Las drogas en la obra de Fray Agustín Farfán, *Asclepio*, 1957, vol. 9, pág. 165-172; Nancy Alexis Chavez Velásquez, *La materia médica en el incanato*, Madrid: Facultad de Farmacia UCM, 1977, Tesis doctoral dirigida por Guillermo Folch Jou y María del Carmen Francés Causapé, publicada Nancy A. Chaves, *La Materia Médica en el incanato*, Lima: Mejía Baca, 1977.

16. Guillermo Folch, Los médicos, la botánica y la materia farmacéutica en España durante la decimosexta centuria, *Asclepio*, 1966-67, vol. 18-19, pág. 141-155.

17. Guillermo Folch Jou, Sagrario Muñoz Calvo, La casa del duque de Gandía. Medicamentos servidos en el siglo XVII, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 1977, XLIII, nº 2, pág.189-204; Estudio socio-económico del medicamento en la España del siglo XVII, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 1979, XLV, nº3, pág. 379-437.

18. María del Carmen Francés Causapé, *Contribución al estudio histórico de la especialidad farmacéutica en España*, Madrid: Universidad Complutense, 1973, dirigida por Guillermo Folch Jou, María del Carmen Francés Causapé *Estudio histórico de la especialidad farmacéutica en España: Tesis doctoral*, Madrid: Facultad de Farmacia, 1975.
19. Guillermo Folch Jou, La bromatología en el siglo XVI, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 1973, vol. 39, nº 4, pág. 385-400; Matilde Santamaría Armaíz *La alimentación de los españoles bajo el reinado de los Austrias*, Madrid: Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, 1987, Tesis doctoral dirigida por Guillermo Folch Jou.
20. Guillermo Folch Jou, Leopoldo Urquía y Malo, El colegio de San Cosme y San Damián de médicos, cirujanos y apotecarios de Calatayud, *Asclepio*, 1953, vol. 5, pág. 215-227; Guillermo Folch Jou, Javier Puerto, Origen y evolución de las corporaciones farmacéuticas españolas, *Atti e memorie della Accademia Italiana di Storia della Farmacia*. 1984 (2) 1-19.
21. Guillermo Folch Jou, *El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Discurso leído en la solemne sesión inaugural del curso 1976-77. el día 20 de enero de 1977*, Madrid: Instituto de España, Real Academia de Farmacia, 1977; Misión analítica del Real Colegio de Farmacia de San Fernando: (una faceta desconocida de esta Corporación en los primeros años de su existencia) *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 1949, nº 6 pág. 729-754; Sagrario Muñoz Calvo, Guillermo Folch Jou, Los estudios de Farmacia en el Madrid de Isabel II, *Anales de la Real Academia de Farmacia* 1984, nº 40, pág. 283-298; José Luis Gómez Caamaño, Guillermo Folch Jou, *Historia del Real Colegio de Farmacia de San Victoriano*, Madrid: Talleres Dalmau, 1958. Dirigió la tesis de Gloria María Tomás Garrido, *Historia de la Facultad de Farmacia de Madrid (1845-1945): contribución a su estudio*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1974, inédita aunque muy consultada y útil.
22. José de la Vega Portilla, *La Botica Real durante la dinastía Austriaca*, Madrid: Marsiega, 1946.
23. María Esther Alegre Pérez, *Veinticinco años en la Real Botica (1783-1808)*, Madrid: Universidad Complutense, 1976 (Tesis inédita dirigida por Guillermo Folch).
24. Sagrario Muñoz Calvo, *Influencia de la Inquisición sobre diversos aspectos de la medicina y farmacia en España*, Madrid: Universidad Complutense, Facultad de Filosofía y Letras, 1974, dirigida por Guillermo Folch Jou, publicado Sagrario Muñoz Calvo, *Inquisición y ciencia en la España moderna*, Madrid: editora Nacional, 1977.
25. Guillermo Folch Jou, Augusta María Gil Esparza, La inquisición y el curanderismo en Canarias durante el siglo XVIII: estudio de un expediente de 1725, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 1971, VI. XXXVII, nº 1, pág. 71-85.
26. Javier Puerto, *La Alquimia en la España del siglo XVII, a través de un manuscrito existente en la Biblioteca Nacional de Madrid*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1978. En el catálogo de la UCM figura como director Guillermo Folch, que en realidad lo fue, aunque administrativamente la tesis se atribuyó a Sagrario Muñoz.
27. Angustias Sánchez Moscoso, *José Rodríguez Carracido*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1968.
28. Pilar Hinojo, *Contribución al estudio de la Farmacia en Navarra*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1952; editada por Gráficas Diana. También dirigió la Tesis doctoral de José María González de la Riva, *Aportación al estudio histórico de la Farmacia en Navarra*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1961.
29. Guillermo Folch Jou, Pilar Herrero Hinojo, La Farmacia en Portugal según su legislación, *Medicamenta*, 1970, tomo 36, nº 271.

30. Guillermo Folch Jou, María Pilar Millán Guitarte, *La Farmacia en Zaragoza a través del tiempo*, Madrid: Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza/ Departamento de Historia de la Farmacia de la Facultad de Farmacia UCM, 1985, cuyo contenido correspondía a la Tesis doctoral de María Pilar Millán.
31. Guillermo Folch Jou, *Farmacia y arte*, textos y prólogo de G. Folch; grabados de Miguel Ángel Lombardía, Oviedo: 1983; *Farmacias de España: breve historia de la Farmacia en España*, (fotografías de Luis Agromayor), Barcelona: Lunwerg, 1986.
32. María del Pilar Hitos Natera, *Índice de los manuscritos existentes en la Biblioteca Nacional de Madrid de interés a la Historia de la Farmacia y ciencias afines con breves comentarios de su contenido*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1967, publicado en 1970 por el *Boletín de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia*.
33. Manuel López León, *Catalogación de libros raros relacionados con la Farmacia de la Biblioteca Nacional*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1975.
34. Guillermo Folch Jou, Sagrario Muñoz Calvo, Victoria Núñez Varela, *Catálogo de los documentos conservados en el Archivo del Departamento de Historia de la Farmacia y Legislación Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Madrid*, Madrid: Publicaciones del Departamento de Historia de la Farmacia, 1982.
35. Varios autores, *IV centenario del Doctor Laguna*, Segovia: Instituto Diego de Colmenares, 1959, reeditado en Salamanca: Junta de Castilla y León, 1990 (es la reimpresión íntegra del tomo XII (números 34 y 35) de la revista *Estudios segovianos*, en el que publicó el homenaje del IV centenario, con un prólogo de Luis Sánchez Granjel. Colaboró en una edición de la *Materia Medicinal de Pedacio Dioscórides*, en la traducción de Andrés Laguna, junto a Otto Mazal y Agustín Albarracín, Madrid: Ediciones de Arte y bibliofilia, 1983.
36. Paula Carrasco Jarabe, *Vida y obra de Pedro Gutiérrez Bueno*, Madrid: UCM, Facultad de Farmacia, 1961, Tesis doctoral inédita.
37. María Luisa Vozmediano Hidalgo, *Ciencias médicas a través de las novelas de Don Benito Pérez Galdós*, Madrid: UCM., Facultad de Farmacia, 1981.
38. Guillermo Folch Jou, Museo de la Farmacia Hispana. Instalado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, *Acofar*, 1972, nº 80, págs. 25-47.
39. Guillermo Folch Jou, Museo de la Farmacia Hispana, catálogo de los botes de Farmacia, *Boletín de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia (BSEHF)*, 1966, nº 66, págs. 51-77. Guillermo Folch Jou, Museo de la Farmacia Hispana; catálogo de los morteros, *BSEHF* 1966, Nº 68, págs. 147-159.
- Sobre el Museo véase también, Javier Puerto, El museo de la Farmacia Hispana. *OFFARM*, 2008, Vol. 27, extraordinario 1, pág. 112-117 y www.ucm.es/info/mhfarhis
40. Guillermo Folch Jou (dir.) *Farmacéutico y Sociedad*, Madrid: Laboratorios Beecham, 1982 y sobre todo Guillermo Folch Jou, *Deberes y responsabilidades del farmacéutico: deontología farmacéutica*, Madrid: publicaciones del Consejo General de Farmacéuticos, 1979.
41. Premio Chemia (1944) y Premio Jerónimo Jiménez Salinas (1948).
42. Su discurso de ingreso fue *Del opio a los modernos alucinógenos: discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia; contestación de Leonardo Gutiérrez Colomer*, Madrid: Real Academia de Farmacia, 1969.

43. Guillermo Folch Jou, Sagrario Muñoz Calvo, *Catálogo de los documentos conservados en el archivo de la Real Academia de Farmacia*, Madrid: Real Academia de Farmacia, 1978.

44. Guillermo Folch Jou, *Los medicamentos ayer y hoy: discurso leído en la solemne sesión inaugural del curso 1971-1972*, Madrid: Real Academia de Farmacia, 1972.

45. Uno de sus cuadros se conserva en la Real Academia Nacional de Farmacia, Carmen Francés, María Isabel Larena, La obra pictórica de los académicos, en relación con la farmacia, en la Real Academia de Farmacia, *Actas-Congressus Historiae Pharmaciae*, 2001, aunque él mismo no le daba ninguna importancia a su entretenimiento y lo consideraba una mera manera de sosegar los nervios.

46. Sobre él sólo hay una biografía temprana de Rafael Roldán Guerrero, *Diccionario Biográfico y Bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*, Madrid: imprenta del P.H.O.E. 1975; un "Homenaje al Dr. D. Guillermo Folch Jou" *Boletín de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia*, año XXXVIII, nº 149-150 y dos libros de homenaje en donde no se habla de su biografía, Javier Puerto (coordinador) *Farmacia e Industrialización*, Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; Cofares; Farmaindustria y la Sociedad Española de Historia de la Farmacia, 1985 y Sociedad Española de Historia de la Farmacia (reunión de 1982) *Homenaje al profesor Guillermo Folch Jou: comunicaciones presentadas a la reunión de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia con motivo de la concesión de la medalla Schelenz al doctor Guillermo Folch*, Madrid: Sociedad Española de Historia de la Farmacia, 1983.

15. GALERÍA DE FOTOS



Figura 1.- Guillermo Folch con toga académica.



Figura 2.- Guillermo Folch Jou. Congreso Internazionale di Storia della Farmacia. 525 años de la fundación del "Collegio Farmaceutico Romano". 6-9-1954.



Figura 3- Entrega de la medalla de académico de la Federazione Ordini Farmacisti Italiani al profesor Guillermo Folch. Congreso Internazionale di Storia della Farmacia. 525 años de la fundación del "Collegio Farmaceutico Romano". 6-9-1954.



Figura 4.- Entrega del diploma de académico de la Federazione Ordini Farmacisti Italiani al profesor Guillermo Folch. Congreso Internazionale di Storia della Farmacia. 525 años de la fundación del "Collegio Farmaceutico Romano". 6-9-1954.



Figura 5.- Guillermo Folch pronunciando el discurso de ingreso como académico de la Federazione Ordini Farmacisti Italiani. Congreso Internazionale di Storia della Farmacia. 525 años de la fundación del "Collegio Farmaceutico Romano". 6-9-1954.



Figura 6.- Guillermo Folch pronunciando el discurso de ingreso como académico de la Federazione Ordini Farmacisti Italiani. Congreso Internazionale di Storia della Farmacia. 525 años de la fundación del "Collegio Farmaceutico Romano". 6-9-1954.



Figura 7.- Inauguración de la instalación para obtener digitalina, 1957. Guillermo Folch, Eva Martínez, Nazario Díez, Berenguer Beneito.



Figura 8.- Toma de posesión como Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España: 30 de enero de 1967.



Figura 9.- Firma del convenio entre el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España y el Instituto Nacional de Previsión. Madrid, 28 de junio de 1967.



Figura10.- Primera lección de cátedra de Guillermo Folch Jou. Enero de 1954. De derecha a izquierda: el profesor Antonio Doadrio; Guillermo Folch; un personaje no identificado y el profesor Abad.



Figura 11.- Conferencia del profesor Folch Jou en Logroño en el año 1969.



Figura 12- Congreso Internacional de Historia de la Farmacia en París. Octubre de 1973. El profesor Folch Jou es el cuarto por la derecha; a su lado una persona desconocida en segundo plano. En primero, la profesora Sagrario Muñoz, el profesor José María Suñé y la doctora María del Carmen Francés. El último de la izquierda es el doctor Ramón Jordi.



Figura 13- Semana farmacéutica de Historia de la Farmacia en Huelva. Mayo de 1972.



Figura 14- Semana farmacéutica de Historia de la Farmacia en Huelva. Mayo de 1972. De izquierda a derecha: Doctor Mariano Turiel; Doctora María Ester Alegre; dos personajes desconocidos en primer y segundo plano; doctor José Luis Valverde con su esposa; la primera esposa del doctor Guillermo Folch y él mismo.



Figura 15.- Semana farmacéutica de Historia de la Farmacia en Huelva. Mayo de 1972.



Figura 16.- El profesor Guillermo Folch recibiendo el “Trifolium campestre” condecoración humorística concedida por los alumnos, en presencia del doctor Antonio Doadrio.



Figura 17.- El profesor Guillermo Folch recibiendo el “Trifolium campestre” de manos de su anterior recipiente, el profesor Ángel Hoyos de Castro.



Figura 18.- Concesión de la medalla de oro de la Facultad de Farmacia en presencia del Doctor Antonio Doadrio y Santos Ruiz. 1981.



Figura 19.- Concesión de la medalla de oro de la Facultad de Farmacia en presencia del Doctor Antonio Doadrio y Santos Ruiz. 1981.



Figura 20.- Visita al museo de profesores orientales.



Figura 21.- Una de las fotografías preferidas del profesor Guillermo Folch Jou tomada durante una conferencia en Cádiz.

Medallas



Figura 22.- De izquierda a derecha y de arriba abajo: medalla de oro de la Facultad de Farmacia de la UCM; insignia de plata de la UCM; regalo efectuado en Milán; medalla de oro de la UCM.

Medallas



Figura 23.- De izquierda a derecha y de arriba abajo; Lauri del Palatino, 1965. Pisa, octubre, 1965; Medalla Herm Schelenz; Medalla de la ciudad de París 1973; Medalla George Urdang, 1983.

medallas



Figura 24- De izquierda a derecha y de arriba abajo; Medalla Academia Internacional de Historia de la Farmacia; medalla de Colegial honorario del Collegium Aromatariorum; Título de concesión de la medalla de honor de la UCM a título póstumo, firmado 28 de enero de 1991; placa concedida por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, marzo de 1986.

Piezas de su colección cedidas al Museo de Farmacia Hispana



Figura 25.- Algunas de las piezas donadas por Guillermo Folch al Museo de la Farmacia Hispana.

Separation between toxin-producing and non-toxic clones of *Microcystis aeruginosa* using lectins

Victoria López Rodas, Raquel González, Eduardo Costas*

Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. E-28040. Madrid, Spain.

Recibido el 14 de octubre de 2011.

e-mail: ecostas@vet.ucm.es

ABSTRACT

Microcystis aeruginosa (the most widespread toxic cyanobacteria worldwide) occurs in dense blooms composed of toxin-producing and non-toxic strains. Current microscopy techniques monitoring of toxic cyanobacteria are unable to distinguish toxic and non-toxic strains. In contrast, a new assay using lectins is able to differentiate among the different *M. aeruginosa* strains based on microcystin production. We analyze thirty-five cultured strains of *M. aeruginosa* isolated from 4 different blooms in three water supply reservoirs and a lagoon as well as a lot of *M. aeruginosa* colonies directly collected from field samples. All non-toxic *M. aeruginosa* strains were positively bound with UEA-1 lectin and by several other lectins. In contrast, the most toxic strains remain unbound. This procedure also was successful in field samples. Although other techniques allow for the differentiation between toxic and non-toxic strains, none of them is as fast, simple and easy as lectin-binding pattern.

Key words: Lectin; *Microcystis aeruginosa*; Toxicity.

RESUMEN

Diferenciación entre clones productores de toxina y no tóxicos de Microcystis aeruginosa mediante el uso de lectinas

Microcystis aeruginosa (la cianobacteria tóxica más extendida mundialmente) es la responsable de “blooms” o floraciones que están compuestos por cepas tóxicas y no tóxicas. Las técnicas de microscopía utilizadas actualmente no permiten distinguir entre las cepas tóxicas y las no tóxicas. Por el contrario, un nuevo procedimiento empleando lectinas es capaz de diferenciar entre las cepas de *M. aeruginosa* basándose en la producción de microcistina. Se analizaron treinta y cinco cepas

aisladas de *M. aeruginosa* aisladas de cuatro blooms diferentes en tres depósitos de abastecimiento de agua y en una laguna, así como una gran cantidad de colonias de *M. aeruginosa* directamente recogidos de muestras de campo. Todas las cepas no tóxicas de *M. aeruginosa* fueron marcadas positivamente con la lectina UEA-1 y por varias otras lectinas. Sin embargo, las cepas más tóxicas permanecieron sin marcar. Este procedimiento también tuvo éxito en muestras de campo. Aunque existen otras técnicas que permiten la diferenciación entre cepas tóxicas y no tóxicas, ninguna es tan rápida y simple como el marcaje por lectinas.

Palabras clave: Lectina; *Microcystis aeruginosa*; Toxicidad.

1. INTRODUCTION

Toxic cyanobacterial blooms in eutrophic lakes, rivers, and reservoirs have been reported during the last decades all over the world (1-4). These toxic blooms have caused the death of livestock and wildlife and illness and even death in humans (5, 6). For example, over 50 patients at a dialysis center in Caruaru, Brazil, died from February to September 1996 of acute liver failure. Although the cyanobacterial species responsible have not yet been identified completely, microcystins produced by cyanobacteria were detected in water from the reservoir and the dialysis center, and in serum and liver tissue of affected patients (7). Other incidents have also been reported in other countries such as China, where cyanobacterial blooms are a great health problem (8-10). Moreover, long-term exposure to low levels of microcystins in drinking water could be a risk factor for liver and colorectal cancer in Europe (11). The World Health Organization has set a provisional guideline value of 1.0 µg.liter⁻¹ for this toxin (10). In addition, cyanobacterial blooms pose a challenge for wildlife conservation because they are caused of repeated mass mortalities of fishes and water birds in wildlife refuges (13-16).

Although more than 40 species of cyanobacteria produce of cyanotoxins, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing is considered the most prevalent harmful species in freshwater ecosystem (1). In fact *M. aeruginosa* is the most important cause of toxic cyanobacterial blooms affecting humans and animals in inland water systems worldwide (1, 7, 17-20).

Microcystins are a group of monocyclic heptapeptide hepatotoxins produced by *M. aeruginosa*, which are the end products of a secondary metabolic pathway synthesized non-ribosomally by multienzymes comprising non-ribosomal peptide synthetases, polyketide synthases and tailoring enzymes (21). These peptides are inhibitors of serine-treonine protein phosphatases 1 and 2A (22-26).

The genetic basis of microcystin production is complex. It has been observed that all the blooms containing microcystin-producing strains also contain related strains that lack the ability to produce this toxin (24). In addition, usually, patches of high- and low-toxin concentration occur simultaneously in the same water body (27, 28). In short, Carrillo et al. (29) and Martín et al. (30) documented a great genetic variability in microcystin production in different *M. aeruginosa* strains isolated from the same waterbloom, very toxic to non-toxic strains occurring together were documented. It is thought that the difference between microcystin producing (toxic) and nonproducing (nontoxic) strains of cyanobacteria lies primarily in the presence or absence of microcystin synthetase gene cluster (31, 32). Finally, it is tested to that the production of toxin in a *M. aeruginosa* bloom also varies with time (24, 28).

Some studies attribute the higher or lower production of toxin to environmental factors such as nitrogen and phosphorus concentration, light intensity or temperature (24, 33). However, laboratory studies have shown that environmental factors induce changes in the concentration of toxins, but to a lesser magnitude than those observed between different strains grown under the same environmental conditions (reviewed by 20).

Combinations of experiments and statistics procedures were employed for estimating the proportion of genetic versus phenotypic variability (heritability) in microcystin net production on 18 *M. aeruginosa* strains. Results indicated that more than 70% of microcystin net production variability is due to genetic differences among strains (34). Consequently, genetic factors appear to be the main cause of the spatial-temporal heterogeneity observed in microcystin production.

Additionally, most of the phenotypic variability for the most important quantitative traits of *M. aeruginosa* (i.e. growth rate, respiration, photosynthetic efficiency, use of inorganic carbon, pigment concentration, photochemical and non photochemical quenching, morphology and others) is also due to genetic differences among strains and not to the environment (35-37).

Since asexual reproduction prevails blooms of *M. aeruginosa* could exist as large clonal families, and consequently clones of ancient divergence can be quite different from one another by mutations. Due to importance of genetic differences for the most significant quantitative traits of *M. aeruginosa* (including microcystin production) analyze and characterize the different strains forming a bloom has a significant environmental relevance.

Nowadays, differentiation of cyanobacteria species and strains are based on modern procedures of molecular genetics (38). PCR procedures focused to identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacteria

species have been carried out successfully (39-41). However, most of water supply enterprises analyze phytoplankton composition from reservoirs through optical microscopy regulated by European legislation (Directive 2000/60/EC) (42) as a routine technique. Consequently, a search for alternative methods based on microscope procedures to differentiate between toxin-producing and non-toxic *M. aeruginosa* strains is vital.

Lectins are carbohydrate-binding proteins or glycoprotein of non-immune origin, which specifically conjugates with monosaccharides or simple oligosaccharides (43). Lectins are important reagents for analyzing cell surface and cell components in bacteria, yeast, protozoa and higher microorganisms (reviewed by 44, 45). They play a role in biological recognition phenomena and the interaction of lectins with the surfaces of microorganisms has been widely applied for typing bacteria and protists (reviewed by 46, 47). In a pioneer paper, Costas & López-Rodas (1994) (48) demonstrated that different species and strains of marine dinoflagellates could be identified microscopically using fluorescent lectins. This lectin-binding procedure is also able to discriminate between toxin-producing and non-toxic strains of marine dinoflagellates of genus *Gymnodinium*. This ability of lectins to bind non-covalently to sugars of surface cells has received early attention in phycological studies. Lectins have been used to differentiate species and strains of several microalgal species (49-51) including toxic dinoflagellates (52, 53) and domoic-acid producing diatoms (54). Lectins were also effective probes for differentiating between different species and strains of *Microcystis sp* (55, 56) and other toxic cyanobacteria species (57). These results indicate that lectins could be useful tools in discriminating species and strains of toxic cyanobacteria.

In this regard, Kehr et al. (2006) (58) report the discovery of a new lectin, microvirin (MVN), isolated from *M. aeruginosa* strain PCC7806, which is involved in cell-cell attachment of *M. aeruginosa*. Apparently, MVN lectin is differentially expressed in microcystin-producing wild type genotypes and mutants lacking the microcystin.

In this study, we analyze the usefulness of fluorescent-labeled lectin assays to microscopically differentiate strains of *M. aeruginosa* that occurs simultaneously within the same and between blooms. Three *M. aeruginosa* blooms in water supply reservoirs of Spain as well as one bloom, which caused mass mortality of wildlife in Doñana National Park (Spain) were analysed. The results suggest that fluorescent lectins are a rapid procedure to microscopically characterize strains and to discriminate between toxic and non-toxic strains of *M. aeruginosa*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 *Experimental organisms and growth conditions*

Experiments were carried out using thirty-five strains of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing from the Algal Culture collection, Genetics laboratory, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain. Strains were collected from water samples of four *M. aeruginosa* blooms. Three blooms occurred in the water supply reservoirs of El Gergal, La Minilla and Cuerda del Pozo (Andalusia, Spain) and the other bloom occurred in Doñana National Park (Spain) causing mass mortality of wildlife (data in 16, 30, 37). These water supply reservoirs provide water to more than 1.5 millions people in Spain. Doñana National Park is classified as a Special Protection Area by the European Union under Directive 79/409, because of its ecological value and international relevance.

Isolation of cells and colonies was made using a Zeiss-Eppendorf micromanipulator-microinjector and each strain was obtained from a single vegetative cell separated from a *M. aeruginosa* colony. Cultures were grown axenically in tissue culture flasks (Greiner, Bio-One Inc. Longwood, NJ, USA) containing 20 ml of cyanobacterial BG-11 medium (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkierchen, Germany), at 22°C and 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over waveband supplied by daylight fluorescent tubes. Clones were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of an inoculum to fresh medium once every two weeks. Under these conditions, all the cultures grew asexually. The absence of bacteria was tested periodically by epifluorescence observation after staining with acridine orange. Only cultures lacking bacteria were employed.

2.2 *Measurement of toxicity*

The toxin production of the different strains was measured as previously described (29, 34). Two quantitative tests for the detection of microcystins residues in water were employed. A microcystin-specific enzyme-linked immunoabsorbent (ELISA) test was used (EnviroGard Microcystin Quantitube Test Kit; Strategic Diagnostic, Newark, N.J., USA) as well as a phosphatase-inhibition based test for the detection of microcystins (Microcystest, ZEU-Immunotech, Zaragoza, Spain), according to the manufacturer's recommendations. The cells of each aliquot were broken by freezing, sonication, and intense agitation. The insoluble cell debris was removed by centrifugation (2500 \times g, 10 min.). Six measurements of each strain were run to estimate confidence intervals. Additionally, the toxicity of the water samples from the four different blooms was also measured using the same procedure.

2.3. Lectin-binding pattern

Lectin-binding was developed using different eight FITC-labelled lectins showed in Table 1 (Sigma Chemical Company, USA). Each of the 35 strains was treated with the lectin at a 0.1 μ M dilution as previously described (48, 50 56). Cells were centrifugated, in order to separate the supernatant and collected the pellet (2500 x g, 20 min), rinsed with BSA to prevent nonspecific lectin binding, and aliquots of 105 ± 103 cells were incubated with each fluorescent lectin for 1 h at 20°C. Subsequently, cells were washed three times in PBS. Additionally, water samples from the four different *M. aeruginosa* blooms were treated with the lectins employing the same procedure.

Table 1.- Lectins used in this study.

Lectin	Abbreviation	Specificity
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	GalNAc
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	Man, Glc
<i>Glycine maxima</i>	SBA	GalNAc, Gal
<i>Phytolacca americana</i>	PWM	GlcNAc
<i>Pisum sativum</i>	PEA	Man, Glc
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	PTA	Gal
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	(GlcNAc) ₁₋₃
<i>Ulex europaeus I</i>	UEA-I	Fuc

The washed cells were evaluated through a Zeiss Axiovert microscope with FITC filter set (450-490 nm excitation and 520-560 nm emission) for epi-fluorescence. All tests were read “blind”: the person reading the test results did not know the origin of the tested material. Three different observers read all samples. In all cases, positive (cells stained with acridine orange) and negative (cells incubated with FITC non-labelled lectins) controls were used.

Images of lecting binding were captured using a digital camera (Canon EOS 450d) connected to a microscopy and were processed using an image analysis programme.

In addition, Statically analysis were done by calculating a non linear regression analysis between toxin production (in μ g microcystin LR-equivalent per cell) versus the number of lectin that positively label the strain, using the computer

software package GraphPad InStat 3.0 (Graph-Pad Software Inc, USA). Differences were considered to be significant $P < 0.01$).

Lastly, a dendrogram was realised using a binary hierarchical cluster analysis (method average linkage using SPSS software; 0 for negative and 1 for positive lectin binding respectively).

3. RESULTS

The results confirmed that optical examination under an epi-fluorescence microscope is a rapid and precise procedure to evaluate the lectin-binding activity. The green fluorescence observed was very intense in the colonies positively labeled with lectins, both at the cell surface as well as on inter-cellular matrix. In addition, a similar staining pattern is shown by all the *M. aeruginosa* colonies from a same strain (as well as all the cells of the same colony).

Experiments assessing presented that several lectins (Con-A, WGA) are able to bind most of *M. aeruginosa* strains. In contrast, other lectins (PNA, SBA) bind to only a limited number of strains. Moreover, the results also confirmed that lectin-binding pattern could allow differentiation among the different strains isolated from a same bloom (Table 2).

A very interesting result was that the lectin-binding pattern and toxin production was related. Lectins are found to be useful tools for differentiating clones of *M. aeruginosa* between toxic and non-toxic strains within a pool of 35 different clones isolated from four different blooms (with a great variety in toxin production). In this sense, lectin from *Ulex europaeus* (UEA-1) showed the most important result: all non-toxic *M. aeruginosa* strains were positively binding with UEA-1 lectin. Contrarily, lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) was able to bind to all clones except the three most toxic (MaD7, MaG8 and MaD1). The other six lectins used in this study demonstrated non-significant affinities to discriminate between toxic or non-toxic clones.

The results reported here indicated that the most toxic strains were labelled by very few lectins. In contrast, non-toxic strains were tagged by numerous strains of lectins. Statistically significant regression was found between toxin production (in fg microcystin LR-equivalent per cell) and the number of lectin that positively label the strain (slope \pm se = -0.0434 ± 0.0044 ; correlation coefficient $r = -0.8677$; $P < 0.001$).

A hierarchical cluster analysis showed three differentiated alignments (Figure 2). These alignments were directly related with the toxin production of each strain. In short, all the non-toxic strains were included in the first alignment. The strains with a moderate microcystin production (from 0.02 to 0.17 μ g

microcystin LR equivalent) were integrated in the second alignment. Finally, the four strains with higher microcystin production (more than 25 µg) are included in the third alignment.

Table 2.- Lectins binding patterns and toxin production (in µg microcystin-LR equivalent per cell) of 35 strains of *Microcystis aeruginosa* isolated from 4 different blooms.

Strain	UEA-1	ConA	PEA	WGA	PNA	SBA	PWM	PTA	Toxin
MaD7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33 ± 0.03
MaG8	-	-	-	-	-	-	-	-	0.31 ± 0.03
MaD1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.28 ± 0.04
MaC5	-	+	-	-	-	-	-	-	0.26 ± 0.08
MaD8	-	+	-	-	-	-	-	+	0.17 ± 0.04
MaG4	-	+	-	+	-	-	-	-	0.16 ± 0.03
MaG3	-	+	+	+	-	-	-	-	0.15 ± 0.04
MaD2	-	+	-	+	-	-	-	+	0.12 ± 0.03
MaD5	-	+	-	+	-	-	-	+	0.11 ± 0.04
MaG6	-	+	-	+	-	-	-	-	0.10 ± 0.03
MaG5	-	+	-	+	-	-	-	-	0.09 ± 0.02
MaM4	-	+	+	+	-	-	-	+	0.09 ± 0.03
MaG7	-	+	+	+	-	-	-	+	0.07 ± 0.02
MaM3	-	+	+	+	-	-	-	+	0.07 ± 0.03
MaD6	-	+	-	+	-	-	-	+	0.06 ± 0.03
MaM9	-	+	+	+	+	-	-	-	0.05 ± 0.03
MaD4	-	+	-	+	-	-	-	+	0.04 ± 0.02
MaM11	-	+	+	+	-	-	-	+	0.04 ± 0.03
MaC1	-	+	+	+	-	-	-	-	0.04 ± 0.03
MaM6	-	+	+	+	-	-	-	+	0.02 ± 0.01
MaM10	-	+	+	+	-	-	-	+	0.02 ± 0.02
MaD3	+	+	+	+	-	+	+	+	Undetectable
MaD9	+	+	+	+	-	+	-	+	Undetectable
MaG2	+	+	+	+	-	-	-	-	Undetectable
MaG9	+	+	+	+	-	+	+	+	Undetectable
MaG15	+	+	+	+	-	-	-	+	Undetectable
MaG16	+	+	+	+	-	-	+	+	Undetectable
MaM1	+	+	+	+	-	-	-	+	Undetectable
MaM5	+	+	+	+	-	-	-	-	Undetectable
MaM2	+	+	+	+	-	+	+	+	Undetectable
MaM13	+	+	+	+	-	-	-	-	Undetectable
MaM14	+	+	+	+	-	-	-	-	Undetectable
MaC3	+	+	+	+	-	-	-	+	Undetectable
MaC4	+	+	+	+	-	-	+	+	Undetectable
MaC6	+	+	+	+	-	-	-	+	Undetectable

In an attempt to raise the knowledge and test whether this discrimination procedure could also works in field samples, the percentage of *M. aeruginosa* colonies negatively labelled by UEA-1 lectin and the water toxicity of each bloom sample were studied. The blooms with less amount of microcystin showed the highest percentage of *M. aeruginosa* colonies positively labelled by UEA-1 lectin

(Table 3). In contrast, the blooms with higher amount of microcystin exhibited the lowest percentage of UEA-1 labelled colonies.

Table 3.- Relation between the percentage of *M. aeruginosa* colonies negatively labelled by UEA-1 lectin from each bloom and the water toxicity observed in each blooms.

Bloom from	% of colonies with negative label by UEA-1 lectin (microcystin-producing)	Water toxicity (in µg/L microcystin LR equivalent)
El Gergal	9%	0.4
La Minilla	4%	0.1
Cuerda del Pozo	29%	1.9
Doñana National Park	63%	4.3

4. DISCUSSION

During the last decades numerous fields of microbiology have been increased use of lectins. The interactions of lectins with microorganisms have been widely applied for the examining of bacteria and protists (47).

Despite little is known about the biological function of lectins in cyanobacteria. Apparently, *Microcystis* lectins seem to play a role in cell-cell recognition and aggregation of single cells to colonies (58). There also appears to be a functional association between microcystin production and lectins. In particular, microcystin has an impact on the expression of MNV lectin of *Microcystis* (58).

Despite of our lack of knowledge about numerous details concerning the biological function of lectins in cyanobacteria, the property of lectins to bind non-covalently to simple sugar and polysaccharides could be a practical method to discriminate among different cyanobacteria strains as well as to discriminate between toxin-producing and non-toxic *M. aeruginosa* strains. Ever since Costas and López-Rodas (1994) (48), the importance of lectins distinguish toxic and non-toxic PSP-producing strains of marine dinoflagellates is well known, despite biological function of lectins in toxic dinoflagellates was not completely elucidated at this moment. Despite the promising results obtained from the use of lectins differing clones of cyanobacteria, this procedure is not currently a routine technique in water supply enterprises (56, 57).

Several works characterizing lectin-binding pattern show that *M. aeruginosa* strains differ in their surfaces properties (59-61). It has been observed that *M. aeruginosa* populations could comprise large clonal families, anywhere

from a few to a hundred strains, differing in a wide range of properties. Since asexual reproduction prevails with blooms, clones of ancient divergence can be quite different from one another due to mutations, selection, chance and history (reviewed in 62, 63). Little is known about the inheritance of these cell surface glycans, which are lectin-binding sites in cyanobacteria, although apparently these glycans show genetic polymorphism and Mendelian inheritance in algae (56). Moreover, strains of ancient divergence apparently show more differences for a lectin-binding pattern than clones of contemporary divergence (56, 64).

After analyzing four distinct blooms, differences in the lectin-binding patterns were found among the diverse strains isolated from a same bloom as well as among the different colonies directly analysed from the same water samples. In this context, this would demonstrate that *M. aeruginosa* blooms are constituted by different strains that differ in composition of cell surface glycans.

From a practical point of view, the most relevant question is elucidating the relationship between microcystin production and lectin-binding pattern. It is well established that not all *M. aeruginosa* cells of a bloom are toxic and cell density cannot be directly related to toxicity. Thus, it would be extremely useful to identify the abundance of toxic cells in a bloom during routine observation of phytoplankton under microscopy that performs most of water supply enterprises, since the visual examination of lectin-binding activity by optical staining quality is a rapid, straightforward and easy method to differentiate *M. aeruginosa* strains. This method could provide an operative typing of *M. aeruginosa* colonies directly collected from the environment.

A significant regression between toxin production and the number of lectin was observed, suggesting that positively lectins-labelled could be a promising way to discriminate between toxic and non-toxic *M. aeruginosa* cells. Since, the most toxic strains are labelled by very few lectins whereas non-toxic strains are labelled by the most of lectins. Thus, it could be assumed that the absence of lectins that label the three most toxic strains indicates a scarce presence of lectin binding sites in the most toxic *M. aeruginosa* strains.

Previous studies have characterized morphospecies and strains of *Microcystis sp.* using lectins (56); however, they did not show the important relationships between lectin-binding pattern and microcystin production. Hierarchical cluster analysis (Figure 1) reveals that lectin-binding pattern of each strain is close related to its microcystin production. Lectin-binding pattern classify the different strains into three different alignments. Firstly, the four strains with higher microcystin production are separated and next separating non-toxic from moderately toxin-producing strains. Taking into account only one strain appears incorrectly aligned strength of this alignment is evident.

UEA-1 lectin seems to be specific enough to bind only to non-toxic *M. aeruginosa* cells. Figure 2 shows the lectin binding activity observed using an epi-fluorescence microscope. Colonies positive for lectin binding showed intense green fluorescence on the cell surface (thin arrows) as well as on inter-cellular matrix (wide arrows) non-toxic *M. aeruginosa* cells. This procedure is extremely useful to identify the abundance of toxic cells in a bloom. It as easy as collected a single water sample directly from a bloom and make a rapid staining procedure and a straightforward observation under an epi-fluorescence microscope is sufficient. With this experimental procedure we were able to successfully separate non toxic and toxic *M. aeruginosa* strains in several water samples from different blooms. As a rule, a larger amount of microcystin indicates more percentage of unmarked colonies by UEA-1 lectin.

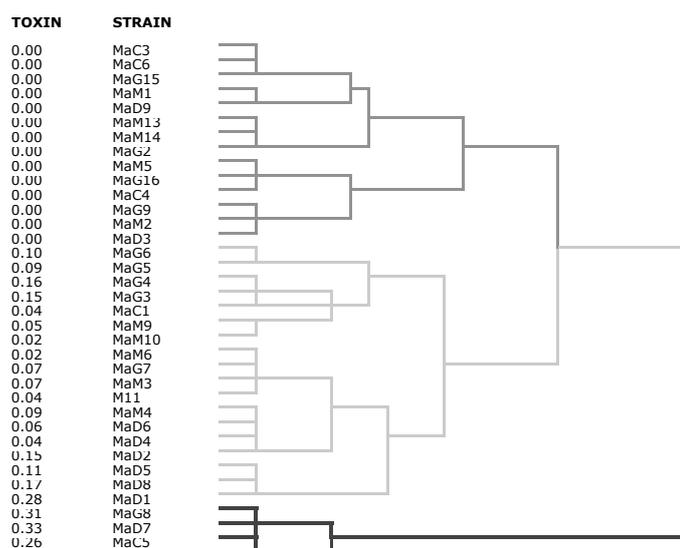


Figure 1.- Hierarchical cluster analysis (dendrogram using a binary average linkage). (MaD- strains from a bloom in Doñana National Park; MaG- strains from bloom in water supply reservoir of El Gergal; MaM- strain from a bloom in water supply reservoir of La Minilla.; MaC- strain from a bloom in water supply reservoir of Cuerda del Pozo. Toxin production of each strain (in fg microcystin-LR equivalent per cell) is also summarized.

In this study, 8 lectins and 35 strains from four *M. aeruginosa* blooms from a restricted geographical range (Spain) were used. Although this work, to the best of our knowledge, is the most extensive lectin-binding study performed on *M. aeruginosa* (by number of lectins, strains, blooms and field samples analysed) is a work limited to *M. aeruginosa* blooms from Spain. Spain is the second biggest European country (and the country with more problems caused for *M. aeruginosa* blooms). Important Spanish water supply enterprises as well as the toxin cyanobacteria-monitoring program of Doñana National Park (which support more than 85% of water-birds European biodiversity) are successfully using this procedure. However, the *Microcystis* problem is a global problem that implicates

other *Microcystis* species (i.e. *M. viridis*, *M. wesenbergii*, *M. floos-aquae*, with scarce occurrence in Spain) as well as other countless unstudied *M. aeruginosa* strains from American, Australian, Asia and Africa. Consequently, more work is necessary, mainly analyzing many *Microcystis* samples from different geographical origin to assure that lectins are a single procedure that can universally differentiate toxic and non-toxic *Microcystis* cells. Finally, these results could lead to affirm that lectin-labeling seems to be a hopeful method for the aforementioned procedures.

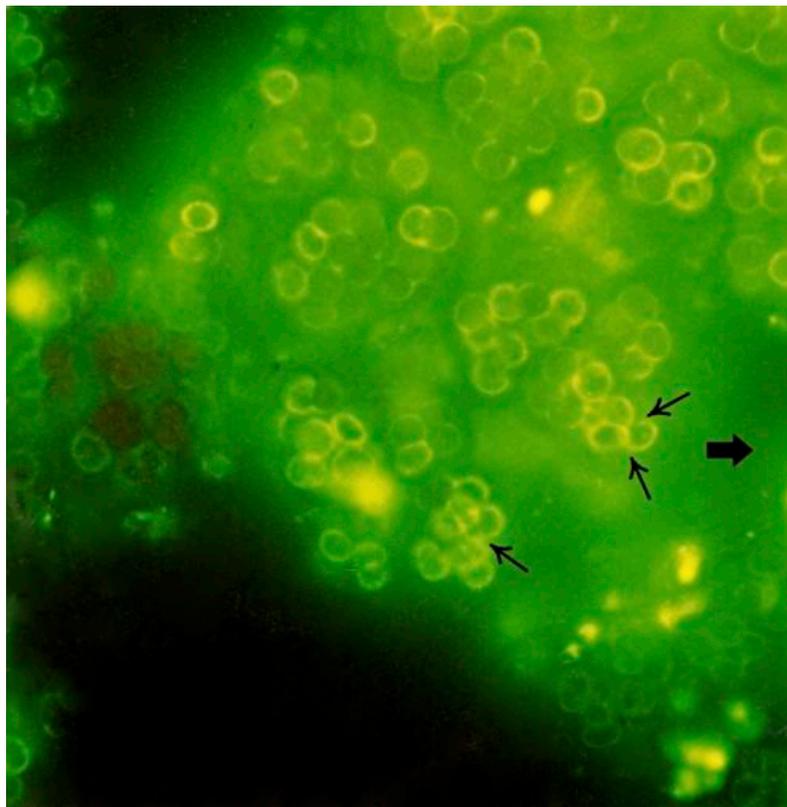


Figure 2.- Lectin binding activity observed using epi-fluorescence microscopy. Positive colonies for lectin binding showed intense green fluorescence on the cell surface (thin arrows), as well as on the inter-cellular matrix (wide arrow).

From an ecological point of view, it has been showed that lectin-binding pattern confirms that each *M aeruginosa* bloom is composed by different strains. Toxic and non-toxic strains occur together in the same bloom. The blooms with less amount of microcystin show high percentage of non-toxic *M. aeruginosa* colonies positively labelled by UEA-1 lectin. In contrast, the blooms with a greater more quantity of microcystin show a low percentage of non-toxic *M. aeruginosa* colonies. As such, lectins seem to be useful tools for analysing changes in the density of toxic and non-toxic colonies over time during the developmental, stationary phase and collapse within the same bloom.

5. CONCLUSIONS

1.- The optical examination of the lectin-binding pattern observed under a fluorescence microscope is rapid assay that allows an operative typing of *M. aeruginosa* colonies directly collected from the environment or from cultures.

2.- The lectin-binding pattern allows differentiating among *M. aeruginosa* strains with a great variety in toxin production isolated from different blooms. All the *M. aeruginosa* colonies from the same strain (as well as all the cells of the same colony) showed similar labeling. This lectin-binding pattern of each strain is close related with its microcystin production. A cluster classified based on lectin binding pattern separates *M. aeruginosa* strains into three different groups: non-toxic, moderate toxicity and high toxicity.

3.- Non-toxic *M. aeruginosa* strains were positively bound with UEA-1 lectin. In contrast, the most toxic strains remain unbound. This procedure also was successful in field samples from *M. aeruginosa* blooms.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work has by been financially supported by the Spanish Ministry of Sciences and Innovation through the grants CTM2008- 05680 C02-01/MAR and CGL2008-00652/BOS. Authors thank the financial support given the project CENIT-VIDA and by the Ministerio de Educación y Ciencia, through FPU program. Special thanks are given Lara de Miguel Fernandez by technical support

7. REFERENCES

1. Skulberg, O.M.; Carmichael, W.W.; Codd, G.A.; Skulberg, R.; In Falconer, I.R. Ed.; Academic Press, London, 1993; p. 145.
2. Gorham, P.R.; Carmichael, W.W.; In Algae and human affairs. Lembi, C.A., Waaland, J.R., Eds.; Cambridge, 1988; p. 403.
3. Carmichael, W.W. (1992). J. of Appl. Microb., 72, 445.
4. Park, H.D.; Bomchul K.; Enkyong Kim.; & T. Okino. (1998). Environ. Toxicol. Water. Qual., 13, 225.
5. Billings, W. H.; In The Water Environment: Algal Toxins and Health. Carmichael W. W.; Ed.; New York 1981; p. 243
6. Falconer, I. R. (1989). Toxicity Assessment, 4,175.
7. Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, J.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.M.D.; Antunes, M.B.D.; De-Melo, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O.; & Jarvis, W.R. (1998). N. Engl. J. Med., 338, 873.
8. Zhang, D.W.; Xie, P.; Liu, Y.Q.; Chen, J.; & Liang, G.D. (2007). Environ. Toxicol. Chem., 26, 171.
9. Zhang, D.W.; Xie, P.; Liu, Y.Q.; & Qiu, T. Sci. Total Environ., 407, 2191.
10. Chen, J.; Xie, P. (2005). Environ. Toxicol., 20, 572.
11. Martínez, J.; López-Rodas, V.; & Costas, E. (2009). Med. Hypotheses, 72, 539.

12. World Health Organization; Guidelines for Drinking Water Quality (W.H.O., Geneva), 1998, 2nd Ed.
13. Matsunaga, H.; Harada, K.I.; Senma, M.; Ito, Y.; Yasuda, N.; Ushida, S.A.; & Kimura, Y. (1999). *Nat. Toxins*, 7, 81.
14. Alonso-Andicoberry, C.; García-Villada, L.; López-Rodas, V.; & Costas E. (2002). *Vet. Rec.*, 151, 706.
15. Carmichael, W.W.; & Hui, R. (2006). *Saline Systems*, 2, 5.
16. López-Rodas, V.; Maneiro, E.; Lanzarot, M.P.; Perdigones, N.; & Costas, E. (2008). *Vet. Rec.*, 162, 317.
17. Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.F.O.; An, J.; Molica, R.J.R.; Jochimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R.; & Eaglesham, G.K. (2001). *Environ. Health Perspect.*, 109, 663.
18. Codd, G.A.; Bell, S.G.; Kaya, K.; Ward, C.J.; Beattie, K.A.; & Metcalf, J.S. (1999) *Eur. J. Phycol.*, 34, 405.
19. Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R.L.; Barreto, V.T.; Ward, C.J.; Preiser, W.; Poon, G.K.; Neild, G.H.; & Codd, G.A. (1998). *Lancet*, 352, 21.
20. Sivonen, K.; Jones, G.; In Cyanobacterial toxins; Chorus, I.; Bartram, J.; Eds.; Routledge; London, 1999; p 41.
21. Tillet, D.; Dittmann, E.; Erherd, M.; von Dohren, H.; Borner, T.; Neilan, B.A.; *Chem. Biol.* 2000, 7, 753.
22. Runnegar, M.T.; Kong, S.; & Berndt, N. (1993). *Am. J. Physiol.*, 265, 224.
23. Jacoby, J.M.; Collier, D.C.; Welch, E.B.; Hardy, E.J.; & Crayton, M. (2000). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57, 231.
24. Kaebernick, M.; & Neilan, B.A. (2001). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35, 1.
25. Kurmayer, R.; Dittmann, E.; Fastner, J.; & Chorus, I. (2002). *Microb. Ecol.*, 43, 107.
26. Dittmann, E.; & Börner, T. (2005). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203, 192.
27. Shirai, M.; Ohtake, A.; Sano, T.; Matsumoto, S.; Sakamoto, T.; Sato, A.; Aida, T.; Harada, K.I.; Shimada, T.; Suzuki, M.; & Nakano, M. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1241.
28. Vezie, C.; Brient, L.; Sivonen, K.; Lefeuvre, J.C.; & Salkinoja-Salonen, M. (1998). *Microb. Ecol.*, 35, 126.
29. Carrillo, E.; Ferrero, L.M.; Alonso-Andicoberry, C.; Basanta, A.; Martín, A.; López-Rodas, V.; & Costas, E. (2003). *Phycologia*, 42, 269.
30. Martín, A.; Carrillo, E.; & Costas, E. (2004). *Limnética*, 23, 153.
31. Nishizawa, T.; Ueda, A.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K.-I.; Ochi, K.; & Shirai, M. (2000). *J. Biochem.*, 126, 779.
32. Meibner, K.; Dittmann, E.; & Börner, T. (1996). *FEMS Microbiol. Lett.*, 135, 295.
33. Kotak, B.G.; Lam, A.K.Y.; Prepas, E.E.; & Hruday, S.E. (2000). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57, 1584.
34. López-Rodas, V.; Costas, E.; Bañares, E.; García-Villada, L.; Altamirano, M.; Rico, M.; Salgado, C.; & Flores-Moya, A. (2006). *Phycologia*, 45, 243.
35. Rico, M.; Altamirano, M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2006). *Phycologia*, 45, 237.
36. Bañares-España, E., López-Rodas, V., Salgado, C., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2006). *Aquat. Bot.*, 85, 159.
37. Bañares-España, E.; López-Rodas, V.; Costas, V.; Salgado C.; & Flores-Moya, A. (2007). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60, 449.
38. Janse, I.; Meima, M.; Kardinaal, W.E.A.; & Zwart, G. (2003). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6634.
39. Pan, H.; Song, L.; Liu, Y.; & Börner, T. (2002). *Arch. Microbiol.*, 178, 421.

40. Hisbergues, M.; Christiansen, G.; Rouhianen, L; Sivonen, K.; & Börner, T. (2003). *Archiv. Microbiol.*, 180, 402.
41. Janse, I.; Kardinaal, W.E.A.; Meima, M.; Fastner, J.; Visser, P.M.; & Zwart, G. (2004). *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 39979.
42. European Parliament. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
43. Goldstein, I.J.; Hughes, R.C.; Monsigny, M.; Osawaand, T.; & Sharon, N. (1980). *Nature*, 285, 66.
44. Pistole, T.G. (1981). Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. *Annu. Rev. Microbiol.*, 35, 85-112.
45. Wu, A.M.; Sugii, S.; & Herp, A. (1988). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 228, 819.
46. Sharon, N.; & Lis, H. (1989). *Science*, 246, 227.
47. Slifkin, M.; & Doyle, R.J. (1990). *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 197.
48. Costas, E.; & López-Rodas, V. (1994). *J. Phycol.*, 30, 987.
49. Fritz, L. (1992). *Korean J. Phycol.*, 7, 319.
50. Costas, E.; González- Chavarri, E.; Aguilera, A.; González-Gil, S.; & López-Rodas, V. (1993). *Bot. Mar.*, 36, 1.
51. Cho, E.S. (2003). *J. Plankton Res.*, 25, 309.
52. Rhodes, L.L.; Haywood, A.J.; & Fountain, D.W. (1995). *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.*, 32, 537.
53. Cho, E.S.; & Costas, E. (2004). *J. Plankton Res.*, 26, 175.
54. Cho, E.S.; Hur, H.J.; Byun, H.S.; Lee, S.G.; Rhodes, L.L.; Jeong, C.S.; & Park, J.G. (2002). *Bot. Mar.*, 45, 346.
55. Álvarez, M.J.; Basanta, A.; López-Rodas, V.; Costas, E.; In: Harmful algae Reguera, B.; Blanco, J.; Fernández, M.L.; Wyatt, T.; Eds.; París, 1998; p 291.
56. López-Rodas, V.; & Costas, E. (1997). *J. Phycol.*, 33, 446.
57. González-Gil, S.; Aguilera, A.; López-Rodas, V.; & Costas, E. (1999). *Eur. J. Phycol.*, 34, 27.
58. Kehr, J.C.; Zilliges, Y.; Springer, A.; Disney, M.D.; & Ratner, D.D. (2006). *Mol. Microbiol.*, 59, 893.
59. Yamaguchi, M.; Ogawa, T.; Muramoto, K.; Kamio, Y.; Jimbo, M.; & Kamiya, H. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265, 703.
60. Jimbo, M.; Yamaguchi, M.; Muramoto, K.; & Kamiya, H. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 499.
61. Bewley, C.A.; Cai, M.; Ray, S.; Ghirlando, R.; Yamaguchi, M.; & Muramoto, K. (2004). *J. Mol. Biol.*, 339, 901.
62. Costas, E. (1999). *Genetica*, 1990, 83, 99.
63. Flores-Moya, A.; Costas, E.; & López-Rodas, V. (2008). *Naturwissenschaften*, 95, 697.
64. Costas, E.; Zardoya, R.; Bautista, J.; Garrido, A.; Rojo, C.; & López-Rodas, V. (1995). *J. Phycol.*, 31, 801.

ANALES VOL 3 2011

Los autores del trabajo "***Estudio comparativo de disgregación de diferentes formulaciones de olanzapina***", Guillermo Torrado Durán, María del Rosario Aberturas Ramos, Jesús Molpeceres García del Pozo, M^a Ángeles Peña Fernández y Alicia Villarubia Penedo, han observado los siguientes errores:

"En ese trabajo comparativo de disgregación de diferentes formulaciones de olanzapina, en el que se estudiaron las diferencias entre los genéricos bucodispersables de olanzapina comercialmente disponibles en España hasta Junio de 2011 y Zyprexa Velotab, de forma errónea (dado que no se trata de un comprimido bucodispersable) se incluyó información referente a Arenbil 10 mg comprimidos recubiertos con película EFG (Qualigén) en las tablas 1, 3, 4 y 5 así como en un video demostrativo. Por lo tanto, debe de eliminarse la información concerniente a Arenbil 10 mg comprimidos recubiertos tanto del texto como de las tablas, gráficos, fotografías y vídeos acompañantes".

ANALES VOL 4 2011

Los autores del trabajo "***The effect of drug loading in different type of lipid formulation and the fate of paclitaxel after dispersion in aqueous media***", Kazi Mohsin y Fars Alanazi, solicitaron la retirada de su trabajo, debido a la gran cantidad de errores que contenía. La editorial aceptó y se suprimió de la edición on line, no debiendo ser considerado en la edición en CD digital.

