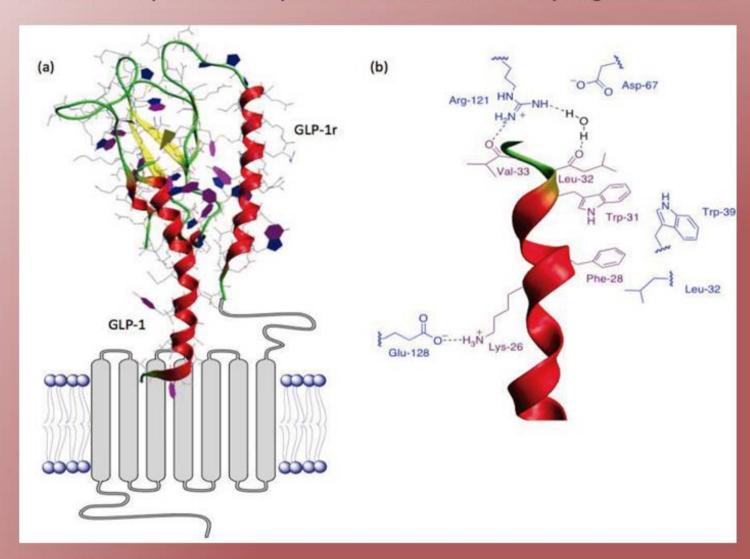
ANALES

DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 79 | Número 4 | Octubre- Diciembre 2013 | Páginas 520-704



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271





Instituto De España



Ministerio de Educación Cultura y Deporte

ARTÍCULO DE OPINIÓN

La investigación bioquímica en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela (entre 1947 y 1981)

José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Manuel Ruiz Amil, José Miguel Ortiz Melón¹

¹Académicos de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia; ex-Catedráticos de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela.

An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 4(2013), pag. 520-529

1. BREVES ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Tratar sobre algo relativo a Bioquímica y a Santiago de Compostela trae inmediatamente a la mente el recuerdo del santiagués ilustre que fue nada menos que el iniciador de la Bioquímica española: Carracido. En efecto, nacido en Compostela, en el seno de una familia de escasos recursos económicos, José Rodríguez Carracido (1856-1928) cursó brillantemente el Bachillerato y la Licenciatura de Farmacia en su ciudad natal, y el Doctorado en Madrid, Universidad donde únicamente era posible entonces hacerlo. Habiendo ganado las oposiciones al prestigioso Cuerpo de Farmacia Militar con el nº 1, a los cinco años pidió la licencia absoluta para poderse dedicar íntegramente a la docencia y a la investigación bioquímicas. Por oposición obtuvo, en 1881, la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia madrileña, pasando, previa otra oposición, a desempeñar, en 1899, la recién creada cátedra de Química Biológica y su Análisis, cuya enseñanza impartió hasta 1926, fecha en que se jubiló (1). Por tanto, Carracido es el primer Catedrático de esta disciplina en España. Dicha cátedra impartió entre aquella fecha y el año 1944 (salvo el paréntesis doloroso de la guerra fratricida) la enseñanza solo para el Doctorado correspondiente a las Licenciaturas de Farmacia, Medicina y Ciencias.

En 1944, con motivo de un cambio de Planes de Estudios Universitarios, el entonces joven Catedrático de Madrid, D. Ángel Santos Ruiz (1912-2005), manteniendo esa docencia, introdujo como obligatorias las asignaturas de Bioquímica Estática y Bioquímica Dinámica en los cursos 5º y 6º, respectivamente, de la Licenciatura de Farmacia (2). (Pasados algunos años, imitando esta iniciativa, se incorporó la Bioquímica en las carreras de Ciencias Químicas, Biología, Veterinaria, Ingenierías Agronómica y de Montes, y se desdobló de la Fisiología en la de Medicina).

En lo concerniente a Compostela, fue nombrado Encargado de dicha enseñanza un santiagués (nacido en 1880), donde se había licenciado con Premio Extraordinario en 1901, y fue más tarde Farmacéutico Militar (habiendo alcanzado el grado de Coronel): el Dr. Luis MáizEleizegui (1).

Con entrega a su trabajo y escasos medios, desempeñó la docencia inicial (únicamente teórica, pues se carecía de laboratorio) de la Bioquímica en Santiago durante los cursos 1947-48 a 1952-53 (y parte del 1953-54).

En diciembre de 1953 fue nombrado, por oposición, Catedrático de Bioquímica Estática y Dinámica de aquella Facultad D. Francisco Pulido Cuchí (1); el cual debe ser considerado como *el primer Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Farmacia compostelana*. No disponía de laboratorio. Generosamente, su colega de Química Orgánica, Prof. José Mª Montañés, le autorizó a usar una parte del de su cátedra, situado en el noble y vetusto edificio conocido como Fonseca, sede de la Facultad hasta hace pocos años. No consta que en él hiciera el Prof. Pulido investigación. Enseguida optó por trasladarse, en 1956, a la cátedra vacante de Granada. Nuevamente, el anciano Dr. Máiz fue nombrado Profesor Encargado de dicha enseñanza.

De todo lo anterior se deduce que solo pudo iniciarse la realización de investigación estrictamente bioquímica en la Universidad de Santiago de Compostela en la época inmediata siguiente.

2. ETAPA DE 1959 A 1969. CATEDRÁTICO: D. JOSÉ A. CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO

El 21 de noviembre de 1959, previa oposición, fue elegido, entre los cuatro aspirantes, Catedrático de Bioquímica Estática y Dinámica de la Facultad de Farmacia de Santiago José Antonio Cabezas Fernández del Campo (1929-) (1, 3). Desde su toma de posesión pocas semanas después y hasta el 30 de septiembre de 1969 –por tanto, prácticamente durante diez años- cumplió el implícito compromiso de permanencia en Santiago (aun sin estar estrictamente obligado a ello, y habiendo tenido posibilidad de trasladarse a Granada poco tiempo después de su llegada a Compostela), hasta que pasó a desempeñar la nueva cátedra de Bioquímica de la recientemente creada Sección de Ciencias Biológicas (pronto convertida en Facultad de Biología) de la Universidad de Salamanca, ciudad donde había cursado sus estudios de Bachillerato y primer año de carrera, siendo también la residencia de su familia desde siglos atrás. En ella ha permanecido hasta su jubilación, en 1999, y continúa actualmente como Emérito (4).

a) El Laboratorio de Bioquímica en 1960

Mientras su predecesor, Prof. Pulido, no tuvo este indispensable espacio, J.A. Cabezas "pronto pudo constatar que era afortunado, al disponer de un laboratorio (aún sin estrenar) ubicado en el pabellón recién construido, adosado al edificio del siglo XVI. El laboratorio mostraba toda su escasa riqueza: una hogareña nevera, varias centrífugas de mesa, algunos desecadores, unos mecheros que se alimentaban con una mezcla combustible formada por gasolina y éter (que semanas antes había hecho saltar la puerta donde se preparaba la mezcla), y poco más"... (5). La escasa superficie total de este laboratorio le resultó un tanto decepcionante; sin duda, por estar acostumbrado a la amplitud y medios instrumentales de las instalaciones de otros como el de Madrid y extranjeros donde hasta entonces había trabajado. Pero consideró enseguida que este aspecto material era secundario, si lograra pronto algunos recursos económicos para "dotar la cátedra a fin de poder desarrollar unas prácticas adecuadas para todos los alumnos y conseguir los instrumentos y revistas esenciales para continuar su línea investigadora. Y ambas cosas se consiguieron en breve tiempo" (5).

Una solicitud al Director General de Enseñanza Universitaria fue aprobada, concediéndose una subvención por valor de la entonces elevada cantidad de 200.000 pts. Mediante ella se adquirieron los aparatos y reactivos esenciales para la realización de prácticas obligatorias por todos los alumnos, además de otras voluntarias, así como para iniciar allí el desarrollo de la investigación tanto individual como en equipo con algunos colaboradores. Desde 1962, coincidiendo con el empuje a la investigación científica promovido por el Químico y Farmacéutico (y también por breve tiempo Farmacéutico Militar) Ministro de "Educación y Ciencia" Prof. Lora Tamayo, se obtuvieron fondos adscritos al investigador responsable, que incrementaron el número y mejor calidad de los aparatos que así pudieron adquirirse: cromatógrafo de gases, supercentrífuga, contador de radioisótopos, etc.

b) Resultados de la investigación

Las "Memorias anuales" (6), en que oficialmente se recogían y publicaban las actividades de cada cátedra, así como otras publicaciones especializadas (7), reflejan objetivamente y de forma resumida los principales resultados conseguidos en el periodo de 1959 a 1969, correspondientes a facetas tales como las siguientes:

- Tesis Doctorales e investigaciones personales: Fueron 6 Tesis (que obtuvieron la máxima calificación) relativas al descubrimiento, identificación, caracterización y cuantificación de ácidos siálicos existentes en diversos materiales biológicos (sueros normales y patológicos, leche, bilis, cerebro, etc., de humanos y varias especies animales, así como huevas de peces) demostrando además la ausencia de estos ácidos en los numerosos materiales de procedencia vegetal investigados.

Según se deduce de una publicación que detalla los Doctorados de la Facultad de Farmacia de Santiago en el intervalo de 50 años (entre 1956 y 2006) (7), las 6 Tesis de Bioquímica del periodo de 1959 a 1969 respecto a las 29 correspondientes a esos 50 años representan el 20,68%.

El Prof. que suscribe publicó en la revista *Biochim. Biophys. Acta* el hallazgo que hizo individualmente en Santiago relativo al ácido siálico que detectó en lágrimas humanas. Además, investigó sobre la naturaleza de los ácidos siálicos de suero de ternera y de gallina (como modelos experimentales de mamíferos y aves), colaborando con los codescubridores de dichos ácidos, Profs. E.. Klenk y H. Faillard, en el "PhysiologischChemischInstitut" de la Universidad de Colonia (Alemania), entre el 2 de enero y el 30 de septiembre de 1962, pensionado por la Fundación Juan March. Y allí volvió a investigar durante todo el mes de agosto de 1965.

Análogamente, aprovechando las vacaciones veraniegas, permaneció entre el 8 de junio y el 8 de diciembre de 1966, también pensionado por la Fundación Juan March, en el "Department of TherapeuticResearch" de la Universidad de Pensilvania (EE.UU.) colaborando con el Prof. L. Warren en investigaciones sobre glicosidasas de procedencia vegetal destinadas a la caracterización de la estructura de glicoproteínas patológicas.

A su regreso a España, sugirió al Prof. Adjunto R. Vázquez Pernas continuar esta línea de investigación, pero en moluscos marinos gallegos. En el verano de 1969, asimismo le facilitó a este colaborador la estancia en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de París –donde él había estado investigando en el verano de 1960- además de a una Ayudante; e igualmente hizo con otro Adjunto, dirigiéndolo a un centro escandinavo para especializarse en el uso de radioisótopos.

- Establecida la modalidad de *Tesis de Licenciatura (= Tesinas)*, fueron *una docena* las que se realizaron, generalmente sobre Bioquímica Clínica, obteniendo la máxima calificación.
- Preferente fue la atención concedida a la participación en Congresos y Simposios bioquímicos, tanto internacionales como nacionales, presentando comunicaciones, o dictando conferencias por invitación. Entre otros: unacomunicación al internacional de Nueva York (año 1964) y otra al de Tokio; una a la recién creada FEBS; dos conferencias y cinco comunicaciones en las Jornadas Bioquímicas Latinas (JBL); una conferencia en la Reunión Internacional de Biología Clínica; una comunicación en la Reunión fundacional de la SEB (Santander, 1961), otras cuatro comunicaciones en otros Simposios internacionales y otras tres en otros nacionales. Por invitación se participó en un simposio patrocinado por la OTAN, celebrado en Portugal, en 1968 (cuando España no pertenecía a esta organización).

- Los resultados de la investigación se publicaron no solo en los correspondientes volúmenes de congresos y simposios como los antes parcialmente indicados, sino también en prestigiosas revistas internaciones como: *Biochim. Biophys. Acta, HoppeSeyler's Z. Physiol. Chem., Clin. Chem., Bull. Soc. Chim. Biol., Clin. Chim. Acta*, etc. También en la *Rev. Esp. Fisiol.*, por sugerencia del Ministerio de publicar en revistas españolas.
- El intercambio de ideas sobre investigación con *especialistas internacionales* se efectuó mediante *conferencias* dictadas por estos, en Santiago. Así, los Catedráticos alemanes E. Klenk y H. Faillard; los franceses J.E. Courtois y M. Leclerc; el *español* M. Losada, etc. (J.A. Cabezas impartió dos conferencias sobre ácidos siálicos en Colonia y Bochum, en 1967).
- Trabajos de investigación solicitadosy en colaboración con otras cátedras fueron realizados con la de Pediatría y con la de Ginecología de la Facultad de Medicina, que plasmaron en dos publicaciones con la primera y en una Tesina con la segunda.

c) Actividades docentes extraordinarias

- Entre 1960 y 1969 se desarrollaron *cinco cursos teórico-prácticos* de *Ampliación de Análisis Clínicos* de un mes de duración, para Licenciados en Farmacia o Medicina.
- Por encargo del Decano, el Catedrático que suscribe impartió durante un curso la asignatura de *Biología* a los estudiantes de Farmacia.
- Aspecto especial es el de la *inauguración de la enseñanza de la Química Biológica*, en el curso 1967-68, continuada en el curso 1968-69, en la recién creada Sección de Ciencias Biológicas, por el Prof. J.A. Cabezas, a petición de las autoridades académicas, labor que realizó durante esos dos años "gratis et amore", hasta su traslado a Salamanca en 1969.

d) Otras actividades académicas

- Durante toda su permanencia en Santiago, J.A. Cabezas fue *Secretario* de la Facultad de Farmacia.
- En 1968, fue nombrado *Académico Correspondiente* de la Real Academia Nacional de Farmacia, donde pronunció su discurso de incorporación y, posteriormente, conferencias.

e) Proyección en ex alumnos

La formación bioquímica adquirida por algunos que fueron alumnos brillantes en la Facultad de Farmacia de Santiago entre 1959 y 1969 cabe pensar que quizá haya podido contribuir a que, por sus propios méritos, bastantes de ellos hayan logrado puestos elevados, como eminentes Investigadores (así, el actual Presidente de la R. Acad. Nac. Farm., Dr. Mariano Esteban) o como Catedráticos,

convirtiéndose en dignos sucesores de sus Maestros (Bernárdez, Calleja, Díaz Fierros, Miñones, Raviña, Simal, Vila Jato), o en otras Universidades (Domínguez-Gil, Fdez. Otero, Jiménez Torres, Mª Abdona López, López Fonseca, Sánchez Tamés), o en la Sanidad o en laboratorios de fabricación de medicamentos o Análisis Clínicos, o en farmacias, etc..

3. ETAPA DE 1979. CATEDRÁTICO: D. MANUEL ROSELL PÉREZ

Habiendo ganado la plaza de Agregado de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca (4), donde figuró solo nominalmente durante algunos meses veraniegos en 1968, sin poder realizar actividad, el 24-VII-1970 fue nombrado Catedrático de Bioquímica Estática y Dinámica de la Facultad de Farmacia de Santiago.

Durante su brevísima permanencia en Compostela (pues el 19-XI-1970 pasó por traslado a la Universidad de Barcelona), en el terreno de la investigación únicamente pudo realizar alguna labor de asesoramiento sobre temas relativos a enzimas, en los cuales era experto. Algún tiempo después falleció en la Ciudad Condal.

4. ETAPA DE 1971 A 1974. CATEDRÁTICO: D. MANUEL RUIZ AMIL

Aunque ya desde su época de estudiante de Farmacia en Madrid y luego recién licenciado (año 1952) M. Ruiz Amil estuvo vinculado a las áreas de Edafología y Fisiología Vegetal, siempre mostró interés por la Bioquímica, trabajando en el CSIC como Becario (entre 1954 y 1957, año este en que se doctoró), Colaborador (1957-65), Investigador Científico (1965-71) y Profesor de Investigación. Previa oposición, fue nombrado Profesor Agregado de Bioquímica en la Facultad de Veterinaria de Madrid en 1971. En ese mismo año accedió a la cátedra vacante de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela.

a) El laboratorio y el personal de esta cátedra

Afortunadamente, el nuevo Catedrático pudo desempeñar su actividad investigadora en las instalaciones del recientemente construido edificio para la Facultad en el campus universitario compostelano. Allí, Ruiz Amil pudo utilizar los libros, revistas, productos y aparatos conseguidos pocos años antes por sus predecesores, y contar con la colaboración de dos experimentados Profesores Adjuntos, de algunos Ayudantes y de varios aspirantes a realizar su Tesina o Tesis.

b) Resultados de la Investigación

- Tesis Doctores: 3 Tesis, dos de ellas relativas al estudio del mejillón (Mytilusedulis) y la otra al del hongo Aspegillusoryzae, fueron mantenidas entre

1973 y 1977 (alguna de ellas estando ya ausente de Santiago su director); y *otra* más, defendida en Granada.

- *Tesis de Licenciatura:3 Tesinas*, sobre el metabolismo del mejillón fueron presentadas entre 1972 y 1976 (una en la Facultad de Farmacia y dos en la de Biología).
- Participación en Congresos: sendas comunicaciones fueron presentadas en 3 Congresos internacionales, y una docena en nacionales, entre 1973 y 1977, sobre enzimas del mejillón, por el Catedrático y algunos de sus colaboradores (frecuentemente R. Vázquez Pernas y A. Carrión).
- Además de en los volúmenes de dichos Congresos, estos resultados fueron publicados en *revistas de la especialidad*, mayoritariamente (*cuatro*) en la *Rev. Esp. Fisiol., tres* más en otras revistas españolas, y *una* en *Comp. Biochem. Physiol.*
- Asimismo, una *Ayuda de la Fundación Juan March*, concedida en 1972, y otra de la *CAYCIT*, permitieron una cierta holgura económica para proseguir las investigaciones.
- Por otro lado, el Prof. Ruiz Amil impartió sendas *conferencias*, en 1972 y 1974, en el Hospital Clínico de Santiago y en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Valladolid, sobre metabolismo glucídico.

c) Actividades docentes extraordinarias

- Entre 1971 y 1974 dicho Profesor impartió –sin contraprestación económica adicional- la enseñanza de la asignatura de *Bioquímica* para los alumnos de la *Sección de Ciencias Biológicas* (pronto convertida en *Facultad de Biología*) de aquella Universidad.
- También participó en el *Curso de Técnicos Superiores en Acuicultura* desarrollando un tema sobre metabolismo glucídico en moluscos, en 1973; y, en 1974, en el *Curso de la UNED* intervino acerca de Bioquímica marina.

d) Otras actividades académicas

- Entre 1972 y 1974 actuó como Catedrático *Supervisor de la Biblioteca* de la Facultad de Farmacia.
- Finalmente, durante esos mismos años, fue *Miembro de la Comisión de Convalidación de asignaturas* de dicha Facultad Compostelana.

5. ETAPA DE 1976 A 1978. CATEDRÁTICO: D. JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN.

a) Antecedentes

Habiendo tomado posesión de su plaza en junio de 1976, el entonces Rector de la Universidad, Excmo. Sr. D. Pablo Sanz (antiguo Profesor en Madrid del nuevo

Catedrático), le ayudó en la tarea de instalarse en aquella ciudad que le era entonces totalmente ajena.

El personal de la cátedra, compuesto por dos Profesores Adjuntos y varios Ayudantes, así como por algún estudiante de Doctorado, mantenía la línea de trabajo desarrollada por los antecesores en la misma, Profesores Cabezas y Ruiz Amil, sobre "enzimas del metabolismo glucídico en el mejillón", que había constituido allí el principal tema de investigación últimamente y que había dado lugar a varias Tesis Doctorales, y a la publicación de varios trabajos en revistas internacionales y nacionales, además de cierta infraestructura de material e instalaciones.

Durante su estancia en Santiago, el Prof. Ortiz proporcionó todo el apoyo posible a este grupo, que continuó manteniendo relación con el Prof. Ruiz Amil para la conclusión de los proyectos en curso.

b) Aportación personal, y Tesis Doctorales y de Licenciatura

- La principal contribución a la investigación en esta cátedra por parte de J.M. Ortiz fue la de iniciar una nueva línea, aprovechando su experiencia posdoctoral adquirida en Gran Bretaña y EE.UU., sobre la *Biología molecular de plásmidos bacterianos de resistencia a antibióticos.* En este tema colaboraron dos estudiantes de Doctorado procedentes del País Vasco, y más tarde se incorporaron cuatro estudiantes procedentes de la Facultad de Farmacia de Santiago. Todos ellos contribuyeron con su esfuerzo al montaje de una nueva línea de investigación, con su tecnología asociada. Estos cuatro últimos, aunque concluyeron la realización de sus respectivas Tesis en Santander, mantuvieron dichas *cuatro Tesis Doctorales* en Santiago. También los mismos, y algún otro, habían hecho previamente sus *Tesinas* en Compostela.

Desde el punto de vista de la *Innovación*, la línea de trabajo mencionada supuso la introducción de la tecnología de trabajo con ácidos nucleicos que incluía el aislamiento de ADN, la hibridación de estos ácidos, la separación de fragmentos de ADN por electroforesis, etc., así como la utilización de algunos elementos de Genética molecular.

c) Participación en la organización de un Congreso en Santiago

- Esta línea de investigación era asimismo de interés para la cátedra de Microbiología dirigida por el Prof. B. Regueiro, con quien se unieron esfuerzos. Dicha colaboración plasmó en la organización del Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología del año 1977, al que asistieron más de un centenar de científicos españoles y un pequeño número de ponentes extranjeros, entre ellos un Premio Nobel. La celebración de este Congreso fue un acontecimiento en Santiago.

d) Proyección en sus discípulos

- Los estudiantes de Doctorado antes mencionados se trasladaron, al finalizar el curso 1977-78, con el Prof. Ortiz a la Universidad de Santander, y son en la actualidad Catedráticos o Profesores Titulares de diversas áreas de conocimiento.

6. ETAPA DE 1978 A 1981. PROFESORA: DÑA. ANA MARÍA GALARZA BASANTA

Procedente del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid (Prof. A. Santos Ruiz), donde ejerció como Agregada durante varios años, pasó a ser Agregada de Bioquímica en la Facultad de Farmacia de Santiago por O.M. de 7-VIII-1978.

Dirigió la *Tesis Doctoral* del Licdo. García Martín (actualmente Prof. Titular de aquella cátedra) sobre deshidrogenasa del mejillón, presentada en 1980. En cinco trabajos de este, publicados en *Comp. Biochem. Physiol.*, a partir de 1982, relativos a enzimas de este molusco, figura (con otros) como coautora.

Con dicho colaborador y otros, aparece también como coautora de sendas comunicaciones sobre este tema presentadas en tres *Congresos* internacionales y en uno nacional que tuvieron lugar entre 1979 y 1983.

Vicedecana de la Facultad durante unos tres meses, fue nombrada Catedrática de Bioquímica de dicha Universidad por O.M. de 16-III-1981. Su cese, por traslado a la Universidad del País Vasco, se produjo el 8-X-1981. Allí falleció en 1985.

7. COMENTARIO FINAL

De los datos aquí aportados puede deducirse:

- 1º) Que los cinco Catedráticos que en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, en el periodo de 1959 a 1981 (es decir, durante una larga veintena de años), enseñaron Bioquímica y realizaron investigación, estuvieron vinculados, directa o indirectamente, por su origen y/o colaboración con el principal impulsor de la Bioquímica española: el Profesor Ángel Santos Ruiz. Así, Cabezas, Ortiz y Galarza fueron sus alumnos de Licenciatura y Doctorado, y luego sus colaboradores en la investigación bioquímica por él dirigida; Ruiz Amil fue brillante alumno de dicho Profesor; y Rosell fue discípulo del Prof. Villar Palasí, quien había sido colaborador del mencionado Prof. Santos.
- 2º) Inicialmente el Prof. Cabezas, y luego los colegas que le sucedieron, siempre superando dificultades, aun a pesar de su a veces corta permanencia en Santiago –excepto la de Cabezas que oficialmente duró 9 años y 10 meses (de los que habría que descontar 9 meses dedicados a su investigación bioquímica en

Colonia y 6 meses en Filadelfia)-, todos ellos, en mayor o menor medida, propiciaron la formación de grupos de investigación y el desarrollo de líneas de investigación que han sido proseguidas ulteriormente por algunos de sus antiguos colaboradores (así, el estudio bioquímico del mejillón gallego, comenzado por el Prof. Adjunto R. Vázquez Pernas en tiempos de Cabezas y continuado por el también Adjunto A. Carrión y otros, en las épocas de los Catedráticos Ruiz Amil, Ortiz y Galarza).

3º) Después de su etapa compostelana, cada uno de estos cinco Catedráticos han continuado, a veces por poco tiempo (ya que pronto fallecieron Rosell y Galarza), la realización de las tareas investigadoras según sus particulares líneas de investigación en las respectivas Universidades a las que se trasladaron, aquí indicadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- MáizEleizegui, L. (1960) Historia de la Facultad de Farmacia de Santiago. (Cien años de vida de la Facultad) 1857-1957. Santiago. Pp. 107, 108., 113-115, 137, 138, 154-156, 167.
- 2.- Cabezas Fernández del Campo, J.A. (2012) Don Ángel Santos Ruiz: Principal impulsor de la Bioquímica española (en sus facetas docente e investigadora). Homenaje a D. Ángel Santos Ruiz en su centenario (1912-2012) An. R. Acad.Nac. Farm. 28 nov., secretaria@ranf.com
- 3.- Roldán y Guerrero, R. (1960) José Antonio Cabezas Fernández del Campo. Bol. Soc. Esp. Farm. Madrid. Pp. 37, 38.
- 4.- Cabezas Fernández del Campo, J.A. (2912) Origen del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca. An. R. Acad. Nac. Farm. 78: 386-400. Secretaria@ranf.com
- 5.- Sanmartín Míguez, J.S. (coord.) (2007). De PharmaceuticaScientia. 150 años de la Facultad de Farmacia (1857-1957). Santiago. Pp. 218, 310, 338, 363-365, 370.
- 6.- VV. AA. "Memorias Anuales" de la Universidad de Santiago de Compostela 1959-1960 1968-69. Cátedra/Departamento de Bioquímica.
- 7.- Miñones Trillo, J. (coord.) (2006) Doutorespola USC de Facultad de de Farmacia 1956-2006. Santiago. Pp.79.

REVISIÓN

Perspectiva general sobre el proceso de desarrollo de fármacos y las técnicas de cribado virtual basadas en la similitud molecular

Óscar Miguel Rivera Borroto^{1, 3*}, Yoandy Hernández Díaz¹, José Manuel García de la Vega², Ricardo Grau¹, Yovani Marrero Ponce³, Maikel Cruz Monteagudo⁴

¹Laboratorio de Bioinformática, Centro de Estudios de Informática, Facultad de Matemática, Física y Computación, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, 54830 Villa Clara, Cuba. ²Departamento de Química Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28049 Madrid, España. ³Unit of Computer-Aided Molecular "Biosilico" Discovery and Bioinformatics Research (CAMD-BIR Unit), Faculty of Chemistry-Pharmacy, Central University of Las Villas, Santa Clara, 54830 Villa Clara, Cuba. ⁴Applied Chemistry Research Center-Faculty of Chemistry and Pharmacy, Molecular Simulation and Drug Design Group, Chemical Bioactive Center, Central University of Las Villas, Santa Clara, 54830, Cuba.

*e-mail: oscarrb@uclv.edu.cu

Recibido el 2 de octubre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 4 (2013), pag. 530-561

RESUMEN

El desarrollo de fármacos es una tarea en extremo compleja pero también muy apreciada por la sensibilidad que genera el impacto negativo de las enfermedades en la sociedad moderna. En este trabajo de revisión se tratarán las características generales del paradigma tradicional del proceso de desarrollo de fármacos. Posteriormente, se abordarán las técnicas de cribado virtual basadas en el concepto de similitud molecular como alternativa racional y complementaria a las primeras fases dicho proceso. En este sentido, se hará énfasis en la búsqueda de similitud y sus componentes esenciales.

Palabras clave: Proceso de desarrollo de fármacos; Técnicas de cribado virtual; Similitud molecular; Búsqueda de similitud.

ABSTRACT

Overview on the drug development process and molecular similarity-based virtual screening techniques

Drug development is a very complex task but also very appreciated by the sensibility that generates the negative impact of diseases in modern society. In this review, we will address the general characteristics of the traditional paradigm of drug development pipeline. Later, virtual screening techniques will be

introduced as a rational and complementary alternative to the early stages of this process. In this sense, we will focus on similarity searching and its key components.

Keywords: Drug development process; Virtual screening techniques; Molecular similarity; Similarity searching.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una terapia para una patología específica es un proceso usualmente estructurado en tres pasos. El primer paso -identificación de la diana biológica o terapéutica- consiste en la identificación de una molécula biológica, mayormente proteínas, involucrada en algún mecanismo que participa en algún proceso patológico. El propósito del segundo paso es identificar una molécula con un perfil biológico interesante, capaz de interferir con el blanco terapéutico antes mencionado. Eventualmente, antes de que el candidato a fármaco entre al mercado, en el tercer paso -validación clínica- debe probar su eficiencia y seguridad a través de una evaluación extensiva en animales y humanos (1, 2).

1.1. Identificación de la diana biológica o terapéutica

El objetivo principal en la investigación terapéutica es interferir alguna vía o señal metabólica responsable de una enfermedad o proceso patológico. Las vías o señales metabólicas son cascadas de reacciones químicas intracelulares que llevan respectivamente a la formación de un producto metabólico que es usado por la célula, o a una alteración de la expresión de un gen debido a la activación de factores de transcripción. La tarea de la investigación terapéutica es encontrar una molécula de fármaco capaz de modificar esta vía mediante la alteración de una entidad clave involucrada en la cascada de reacciones correspondiente: el blanco terapéutico. La identificación del blanco involucra conocimientos tanto biológicos como químicos, con el objetivo de descubrir blancos potenciales y conocer en qué medida este puede ser alterado por una molécula de fármaco (2). Previo a la fase de descubrimiento de fármacos, el blanco terapéutico identificado debe ser validado con el objetivo de demostrar su papel determinante en la enfermedad. Esta validación usualmente involucra experimentos *in vitro* e *in vivo* (3).

1.2. Descubrimiento de fármacos

En este segundo paso, el objetivo es encontrar una molécula pequeña, denominada ligando, capaz de unirse mediante fuerzas intermoleculares al blanco biológico y alterar su funcionamiento normal. Esta interacción se dice que es directa cuando el fármaco se une al sitio activo del blanco y compite con su sustrato natural, o indirecta si el fármaco se une a un sitio secundario e induce cambios en la conformación química del blanco, modulando así su afinidad con el ligando natural (4). Para cuantificar la actividad del ligando, correspondiente al

grado de interacción con el blanco, se debe diseñar un procedimiento experimental denominado ensayo de la actividad biológica. La actividad de las moléculas candidatas puede ser subsecuentemente ensayada con el objetivo de encontrar candidatos a fármacos, o compuestos líderes, capaces de interferir con el blanco a bajas concentraciones (1). La identificación de candidatos prometedores en esta vasta (casi infinita) cantidad de moléculas depende fuertemente de la pericia bioquímica y que tradicionalmente se logra en un proceso iterativo, denominado como el *ciclo de descubrimiento de fármacos* que alterna entre los pasos de selección, síntesis y ensayo biológico de los candidatos, guiando este último al próximo paso de selección (5).

Durante los ensayos biológicos iniciales del ciclo de descubrimiento de fármacos son identificados las entidades noveles o "hits". A esta fase de generación de *hits* le sigue la fase de generación de cabezas de serie, líderes o "leads", donde los *hits* identificados son validados mediante ensayos confirmativos y refinados estructuralmente con el objetivo de incrementar su potencia con respecto al blanco. De lograrse una potencia suficiente, se pueden realizar ensayos biológicos adicionales para asegurar que el compuesto líder no interacciona con proteínas homólogas al blanco, con el fin de limitar sus efectos secundarios (6).

Hasta este punto, es posible identificar compuestos líderes con perfiles de unión al blanco adecuado. Sin embargo, el fármaco no solo debe interferir con el blanco terapéutico, sino que además debe poseer un perfil biológico favorable, específicamente una toxicidad baja, de manera que no sea dañino para el organismo, y propiedades farmacocinéticas adecuadas. De manera general, la farmacocinética está relacionada con el comportamiento de un fármaco en el organismo, tales como su capacidad de pasar al torrente circulatorio y alcanzar el blanco, y ser posteriormente destruido y eliminado por el organismo. Las principales propiedades farmacocinéticas se resumen en el acrónimo ADME, que incluye los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (7, 8).

De este modo, el desarrollar un medicamento exitoso es el resultado del descubrimiento del mejor compromiso entre numerosos objetivos que muy a menudo compiten entre sí. El fracaso de un candidato a fármaco con una potencia adecuada durante el proceso de desarrollo es debido principalmente a una pobre biodisponibilidad, y/o toxicidad (9). De forma simplificada, el fármaco ideal debería tener la mayor eficacia terapéutica y biodisponibilidad, y la mínima toxicidad posible, lo que evidencia la naturaleza multiobjetiva del proceso de descubrimiento de fármacos (ver Figura 1). Lo anterior sugiere que en la fase de optimización del líder, la capacidad de mejorar el perfil terapéutico del candidato seleccionado basándose solamente en su actividad farmacológica se ha sobreestimado lo que refuerza, durante la fase de identificación del líder, considerar las propiedades toxicológicas y farmacocinéticas del candidato

paralelamente a sus propiedades farmacológicas en etapas anteriores a la optimización (10). Todo lo anterior ha llevado tanto a la academia como a la industria farmacéutica a una reconsideración del paradigma secuencial del proceso de descubrimiento de fármacos en favor a un enfoque multiobjetivos del proceso del mismo (11, 12).

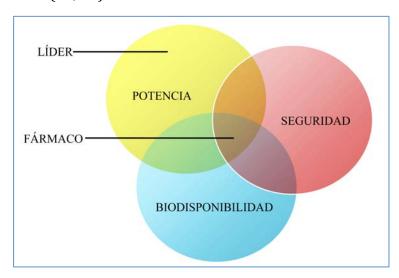


Figura 1.- Ilustración gráfica del compromiso entre eficacia terapéutica (potencia), biodisponibilidad (propiedades ADME) y toxicidad (seguridad) requerido para alcanzar un fármaco exitoso.

La fase final del descubrimiento de fármacos es la fase de optimización del líder, donde se refina la estructura química del mismo de manera que cumpla con los criterios requeridos para convertirse en un fármaco. Este proceso de optimización es altamente iterativo y se considera la fase más crítica del proceso de descubrimiento de fármacos ya que es aquí donde ocurre la mayor cantidad de fallas. Una vez descubierto un compuesto líder con características de fármaco prometedoras, el paso final hacia la puesta en el mercado del fármaco es la fase de validación clínica (11).

1.3. Validación clínica

Previo a la puesta en el mercado, el candidato a fármaco debe ser validado durante una fase de prueba extensiva, dirigida a demostrar su eficacia y seguridad para el organismo humano: la *validación clínica*. Esta fase comienza con la realización de pruebas preliminares de seguridad en animales, la etapa preclínica, y es subsecuentemente articulada en tres fases (11):

- Fase I (1 a 2 años): Inicialmente se llevan a cabo pruebas de seguridad con un número limitado (< 100) de personas sanas.
- Fase II (1 a 2 años): Seguidamente se llevan a cabo pruebas de seguridad y eficacia a una muestra mayor compuesta por cientos de personas que incluye grupos de sanos y enfermos.

• Fase III (2 a 3 años): Finalmente, el estudio se completa con la realización de pruebas de eficacia a gran escala, las que involucran una muestra mucho mayor de personas (miles) de diferentes áreas demográficas.

Eventualmente, una vez previstos los resultados de este estudio clínico y concedida la aprobación gubernamental, entonces puede comenzar la explotación comercial del fármaco. La aprobación gubernamental es concedida, por ejemplo, por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés Food and Drugs Administration) en los Estados Unidos de América, por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, del inglés European Medicines Agency) en la comunidad Europea, por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en España o para el caso particular de Cuba por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).

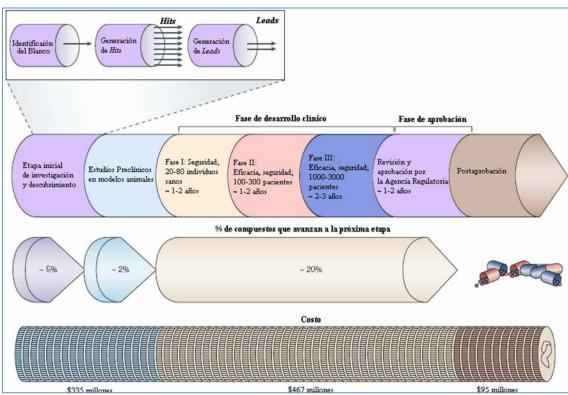


Figura 2.- Representación esquemática general del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos.

Un estudio relativamente reciente llevado a cabo por el *Boston Consulting Group* (BCG) y que involucró a 50 compañías e instituciones académicas, mostró que el coste de desarrollo de un nuevo medicamento desde la identificación de su diana farmacológica, el descubrimiento y optimización de uno de los nuevos compuestos líderes, el desarrollo de los ensayos clínicos requeridos y su uso autorizado en terapéutica es como promedio de 880 millones de dólares (USD) y se necesita también como promedio un período de 15 años de investigación [ver figura 2] (13)

1.4. Necesidad de nuevos paradigmas

Hasta los años 80, el paso de generación de hits o candidatos potenciales (moléculas que muestran una determinada actividad química pero que no necesariamente cumplen con los requerimientos de eficiencia de un lead o compuesto líder) constituía el principal paso limitante del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (DDDP, del inglés Drug Discovery and Development Process) debido al costo de la síntesis y evaluación de nuevas moléculas (10). Durante esta etapa las esperanzas de resolver el problema del DDDP fueron puestas en el desarrollo de las tecnologías de alto rendimiento (14) y la química combinatoria (15), a través de una paralelización masiva del proceso. En la práctica, se evidenció que si no eran utilizadas cuidadosamente, el uso indiscriminado de estas técnicas podría conducir a un aumento dramático del número de moléculas o candidatos, de manera que el descubrimiento de un nuevo fármaco sería como hallar una aguja en un pajar. Mientras que el número de hits identificados pudo ser incrementado sustancialmente, se observó que no existía una correspondencia con el crecimiento del número de fármacos que entraban al mercado, dejando esto claro que el verdadero paso limitante del descubrimiento de fármacos no era la generación de hits, sino los pasos de identificación y optimización del compuesto líder (10). Como resultado, este tipo de solución a gran escala ha sido abandonada progresivamente en los últimos años, favoreciéndose una racionalización del proceso, en la que los métodos computacionales han ganado una importancia creciente (10).

2. MÉTODOS COMPUTACIONALES O IN SILICO

Debido a la necesidad de explotar las cantidades masivas de datos generados por las tecnologías de alto rendimiento, los métodos computacionales se han ido implementando de manera creciente en el proceso de descubrimiento de fármacos (7). Para unificar la combinación de los métodos computacionales y la Química Medicinal, F. K. Brown acuñó en 1998 el término "quimioinformática" definiéndola como: "la combinación de aquellos recursos de información para transformar datos en información y la información en conocimiento con el propósito de tomar mejores y más rápidas decisiones en el área de la identificación y optimización de compuestos líderes" (16). Actualmente, este concepto aparece definido de una manera más amplia para considerar la quimioinformática como "la aplicación de métodos informáticos para resolver problemas químicos" (17). Esta definición general engloba múltiples aspectos como la representación, almacenamiento, recolección y análisis de la información química en un sistema informático. Algunos de los frentes de trabajo abiertos en esta área relativamente joven continúan siendo la minería de textos químicos, los estudios QSAR, el diseño de fármacos basado en estructura y el diseño de fármacos basado en fragmentos (18).

2.1. Cribado virtual

El cribado virtual (VS, del inglés Virtual Screening) *in silico* consiste en el análisis computacional de bases de datos de compuestos, dirigido a identificar y seleccionar un número limitado de candidatos que posean la actividad biológica deseada sobre un blanco terapéutico específico (19). Este paradigma "más racional" puede verse como una alternativa al cribado de alto rendimiento (HTS, del inglés High Throughput Screening) con las ventajas de que pueden ser evaluadas *in silico* cantidades arbitrarias de moléculas reales o virtuales y se pueden ahorrar como promedio 140 millones de USD y 0.9 años por cada fármaco (20). En esencia, los enfoques HTS y VS poseen una naturaleza complementaria entre sí, por cuanto se han introducido varios y diversos conceptos y métodos computacionales para analizar datos de cribado experimental, extraer conocimiento de los experimentos HTS y derivar modelos predictivos de actividad (21).

En la práctica, el cribado virtual requiere del conocimiento de la estructura del blanco terapéutico, usualmente obtenido por métodos cristalográficos, o de la actividad, medida experimentalmente, en un conjunto de compuestos. Si la estructura de la diana farmacológica es conocida, el enfoque más común para el cribado virtual son los estudios de acoplamiento o "docking", los que consisten en la derivación de una puntuación o "score" de la actividad a partir del posicionamiento óptimo del ligando en el sitio activo del blanco (6). Este enfoque de cribado virtual suele brindar los resultados más confiables y al mismo tiempo resulta atractivo por el gran número (alrededor de 500) de dianas farmacológicas disponibles (ver Figura 3).

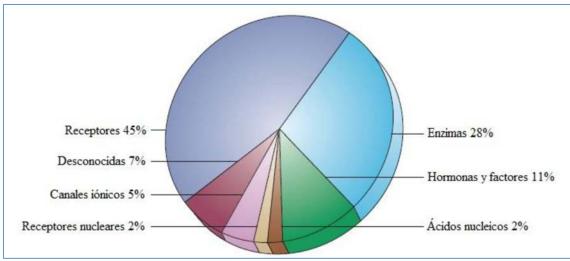


Figura 3.- Dianas farmacológicas distribuidas en siete clases bioquímicas principales, donde las enzimas y receptores representan la parte mayoritaria.

Si se desconoce la estructura del blanco, los métodos de cribado virtual pueden derivarse de un grupo de compuestos con actividad conocida obtenidos de ensayos experimentales previos. Estos métodos se conocen como enfoques de cribado virtual basados en ligandos, en oposición al enfoque anterior basado en la estructura del blanco. Alternativamente, el conjunto de compuestos activos puede usarse para derivar un *modelo farmacóforo* que puede usarse como un filtro para eliminar aquellos compuestos que no cumplan con las condiciones de actividad necesarias (22).

Una de las herramientas más simples y populares del cribado virtual de conjuntos de datos quimio(bio)informáticos lo constituye la búsqueda de similitud, la cual es ampliamente utilizada en las etapas más tempranas de los programas de descubrimiento de líderes. Su función principal es identificar los compuestos activos que más se asemejan a la estructura de referencia que luego pueden servir de base para más estudios detallados de cribado virtual que emplean técnicas más refinadas (23). Dentro de las técnicas más usadas en el análisis de diversidad de bibliotecas de cribado y combinatorias se encuentran los algoritmos de agrupamiento, cuya idea esencial consiste en subdividir el conjunto de moléculas en grupos o clústeres de modo que la similitud intra cluster sea máxima mientras que la similitud inter clúster sea mínima; los algoritmos de partición, que consisten en subdividir el rango de valores de un pequeño grupo de características, relevantes a la unión del ligando al receptor y previamente identificadas por el investigador, en sub rangos, cuya combinación genera una malla *n*-dimensional de celdas a las cuales son asignadas las moléculas del repositorio, de modo que los valores de las características estudiadas en las mismas concuerden con aquellos "encerrados" en una celda específica; los algoritmos basados en disimilitud, que a diferencia de los anteriores buscan identificar directamente un subconjunto diverso mediante la selección iterativa de compuestos que son lo más diferentes posible a aquellos que han sido seleccionados previamente; y los algoritmos basados en optimización, que parten de definir una medida de diversidad cuantitativa y entonces la selección del conjunto más diverso posible se formula en términos de los problemas de optimización combinatoria (24).

Algunos estudios previos sugieren que los algoritmos de agrupamiento brindan un mejor balance entre representatividad y diversidad que otras técnicas basadas en disimilitud para el análisis de diversidad (25,26). Un estudio muy reciente que aborda la comparación de varios de los algoritmos de agrupamiento más exitosos en Quimioinformática (i.e., la clase de los algoritmos no superpuestos, jerárquicos, aglomerativos, secuenciales y combinatorios, CSAHN) puede encontrarse en (27). En este contexto, atención especial merecen las técnicas rápidas de tendencia al agrupamiento que permiten obtener una evaluación de la "predisposición" de los datos químicos a ser agrupados antes de ejecutarse la técnica de agrupamiento en sí. La importancia práctica de estas técnicas radica en evitar formarse una idea errónea acerca de la organización de los datos como estructurados en clústeres cuando en realidad provienen de una única población

aleatoria, además que evitan el malgasto de recursos computacionales y de tiempo (28).

Un enfoque más exacto de los métodos de cribado virtual consiste en la construcción de un modelo que correlacione la estructura de las moléculas con sus respectivas actividades biológicas a partir de un grupo de moléculas previamente evaluadas. Este problema se conoce como la modelización de la relación estructura-actividad (REA) más comúnmente conocido por sus siglas en inglés QSAR, acrónimo de Quantitative Structure-Activity Relationship, e involucra métodos de los campos de la Estadística y el Aprendizaje Automático (29, 30). La utilidad práctica de este enfoque se ha constatado, por ejemplo, en estudios de identificación de nuevas entidades anti protozoarias (*Trichomona vaginalis*) mediante la técnica estadística Análisis Discriminante Lineal usando descriptores moleculares definidos por el Prof. Dr. Yovani Marrero Ponce (31-33). Este enfoque también se ha aplicado en el descubrimiento de fármacos frente a la *enfermedad de Chagas* (34). Algunos de los algoritmos más populares en el área de la minería de datos pueden estudiarse en (35).

3. GENERALIDADES DE LA SIMILITUD MOLECULAR

El concepto de similitud ha ganado un espacio cada vez más importante en la quimioinformática debido fundamentalmente al principio de similitud, el cual plantea que moléculas con estructuras similares tienden a exhibir propiedades similares (36). Este principio parece ser una adaptación de un proceso que, según algunos autores, es el reflejo directo del núcleo del sistema cognitivo humano, el razonamiento por analogía (37), y ha sido apoyado por un buen número de resultados experimentales [ver por ejemplo referencia (38)]. Sin embargo, otros hallazgos han sugerido que eventualmente moléculas estructuralmente similares exhiben comportamientos disimilares, así como moléculas estructuralmente disimilares exhiben comportamientos similares (39). Para sistematizar este cuerpo de evidencias algunos autores han propuesto, en el contexto del diseño de fármacos, un cuadro (matriz de confusión) de cuatro hipótesis bayesianas, i.e., i-) moléculas estructuralmente similares es muy plausible que tengan actividades similares, ii-) moléculas estructuralmente similares es plausible que tengan actividades disimilares, iii-) moléculas estructuralmente disimilares es plausible que tengan actividades similares, iv-) moléculas estructuralmente disimilares es muy plausible que tengan actividades disimilares (40). Las hipótesis i-) y iv-) conforman la lógica de base para técnicas como la búsqueda de similitud y los algoritmos de agrupamiento para la selección de compuestos intra clúster (41, 42). La hipótesis ii-) conforma la lógica de base de un grupo de técnicas novedosas para el análisis y visualización de los acantilados de actividad y una de sus aplicaciones potenciales es la identificación de pequeños cambios moleculares responsables de un cambio

abrupto en la actividad, que de por sí conlleva un gran interés (43). Por último, la hipótesis iii-) conforma la lógica de base de técnicas basadas en diversidad para la búsqueda de estructuras patrones o "Scaffold Hopping", que se refiere a la capacidad para identificar clases estructurales diferentes de compuestos activos a través del cribado computacional y constituye el criterio de éxito más importante en las aplicaciones de cribado virtual prospectivo (44).

3.1. Técnica de búsqueda de similitud

La búsqueda de similitud es una de las técnicas de cribado virtual más simples (vide supra), en la cual una estructura bioactiva conocida se usa como consulta frente a una base de datos para identificar las moléculas vecinas más cercanas, que al mismo tiempo son las más probables que exhiban la bioactividad de interés (45). En la literatura se han reportado varios estudios comparativos entre técnicas de búsqueda de similitud resaltando sus meritos y deficiencias [ver por ejemplo (46)]. Sin embargo, como Sheridan y Kearsley (2002) han señalado, es muy poco probable que un solo mecanismo de búsqueda pueda comportarse consistentemente superior a los demás en todos los problemas (47). Por esta razón, tiene sentido aplicar técnicas de búsqueda complementarias y combinar los resultados individuales en un resultado consenso para extender el dominio de problemas con resultados satisfactorios, este enfoque se ha dado a conocer en los últimos años como fusión de datos (48).

3.2. Componentes de la búsqueda de similitud

La búsqueda de similitud molecular comprende cuatro componentes esenciales: el conjunto de datos estructurales químicos, que cubre cierta región del espacio químico a explorar; las estructuras de referencia o consulta, que contienen la información química de interés a recuperar; la representación matemática de los compuestos químicos, a través de descriptores moleculares; la medida de (di)similitud, que cuantifica el grado y tipo de semejanza entre dos compuestos químicos; y el algoritmo de emparejamiento o "matching", cuya función es buscar y recuperar los compuestos más parecidos a la molécula de referencia (49).

3.2.1. Conjuntos de datos químicos

El desempeño de los índices de similitud, descriptores moleculares e, incluso, enfoques de validación, es altamente dependiente de las bases de datos de entrenamiento y prueba. Actualmente existe un número considerable de conjuntos de datos estructurales para la evaluación práctica de las técnicas de cribado virtual, de entre los más populares se encuentran: la mega base de datos del proyecto PubChem, disponible gratuitamente (50); la base de datos de los cribados anti-VIH y anti cancerígeno del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, del inglés National Cáncer Institute), disponible gratuitamente (51); los repositorios de datos de la Sociedad de Quimioinformática y QSAR, disponibles gratuitamente (52); los

conjuntos de datos de la Academia Internacional de Química Matemática, disponibles gratuitamente (53); la base de datos MDDR (MDL Drug Data Report), comercial; la base de datos WDI (World Drug Index), comercial (54); y la base de datos WOMBAT (World of Molecular Bioactivity Data), comercial (55). La tendencia actual de las bases de datos quimioinformáticas es pasar al dominio público (56, 57).

Especial atención merecen los conjuntos de datos para propósitos de comparación de nuevas herramientas de cribado. En la literatura se recomienda el uso de los conjuntos de datos MUV diseñadas por Rohrer et al. (2009). Estos conjuntos de datos de compuestos activos y señuelos de activos "decoys" (inactivos confirmados) fueron construidos usando herramientas estadísticas de diseño experimental basadas en la técnica del análisis refinado de los vecinos más cercanos y están orientadas a minimizar problemas encontrados con el uso de las métricas de desempeño (vide infra) en otros conjuntos de validación como el enriquecimiento artificial, donde la clasificación es causada por diferencias en propiedades simples y usualmente irrelevantes entre activos y decoys; el sesgo de análogos, causada por la tendencia de los conjuntos de datos a sobre representar las clases de activos y deriva en una clasificación sobreestimada de los mismos. Estos dos problemas se tienden a englobar en el problema denominado sesgo de conjuntos de datos de referencia. El último problema de este tipo se refiere a la *varianza de los resultados de validación*, causada por usar conjuntos indebidamente desbalanceados que conducen al efecto de saturación de las curvas ROC correspondientes (58). En los últimos años, algunos autores han alertado acerca de otro tipo de problemas más sutiles que concierne la calidad de conjuntos de datos altamente referenciados como son los errores estructurales, presencia de compuestos duplicados, errores de correspondencia de los datos estructurales con las mediciones experimentales, falta de reproducibilidad en las mediciones experimentales, etc. Los hallazgos sugieren que el tener estructuras erróneas representadas por descriptores erróneos deriva en un efecto perjudicial para el desempeño y la fiabilidad de las predicciones de los modelos de cribado. Para solucionar estos problemas los investigadores proponen se utilicen un buen número de potentes herramientas de software libre así como una última etapa de inspección "manual" (59).

Hasta el momento, la comunidad científica internacional no ha adoptado ningún conjunto de datos estándar para la comparación de medidas de similitud, probablemente por la imposibilidad de encontrar un grupo único de moléculas que reagrupe todas las necesidades de cribado de la Quimioinformática moderna (39). Por este motivo se ha sugerido que, para validar un método nuevo, los investigadores deben presentar al menos 10 conjuntos con actividades diversas con más de un estándar de comparación (47).

3.2.2. Espacio químico y representación molecular

Cercanamente aliado con la noción de similitud molecular es el de *espacio químico*. Los espacios químicos proveen un medio para conceptualizar y visualizar la similitud molecular. El concepto de espacio químico se deriva de la noción de espacio usado en Matemáticas y consiste en un conjunto de moléculas y un conjunto de relaciones asociadas (similitudes, disimilitudes, distancias) entre las moléculas, lo cual le da al espacio una "estructura" (60).

El espacio químico se puede describir usando una codificación *basada en coordenadas* o una codificación *libre de coordenadas* de las estructuras químicas. En la codificación individual de moléculas (espacio basado en coordenadas), cada molécula se describe mediante un vector de fragmentos o subestructuras, traducido posteriormente en un vector de descriptores moleculares (DMs) y, por tanto, tiene una posición absoluta en un espacio multidimensional. La dimensión de este espacio se especifica por el número de rasgos no correlacionados (descriptores de complejidad, descriptores de solubilidad, huellas dactilares o "fingerprints", tripletes de farmacóforos, u otro vector de descriptores). Por otra parte, en la codificación por pares de moléculas (espacio libre de coordenadas) solo se calculan las distancias entre dos moléculas usando una medida de similitud explícita o implícita. La posición absoluta de las moléculas en este espacio se puede calcular solamente si se miden todas las distancias por pares y se conoce la dimensionalidad del espacio (descriptores de pares de átomos, árboles de rasgos, enfoques de Subestructura Máxima Común) (61-63).

Cuatro tipos de objetos matemáticos se utilizan normalmente para representar las moléculas, estos son: conjuntos, grafos, vectores y funciones. Los conjuntos son los objetos más generales y, básicamente, la base de los otros tres. Normalmente, los químicos representan moléculas como "grafos químicos" (64), que están estrechamente relacionados con los tipos de grafos tratados por los matemáticos en el campo de la teoría de grafos (65).

Los grafos químicos proporcionan una metáfora potente e intuitiva para la comprensión de muchos aspectos de la química, pero sin embargo tienen sus limitaciones, especialmente cuando se trata de cuestiones de interés en la quimiometría y quimioinformática.

En estos campos de información molecular se representan normalmente los vectores de características, donde cada componente corresponde a una función local o global característica de una molécula. Las características locales incluyen fragmentos moleculares (subestructuras), farmacóforos (66), varios índices topológicos (67), y cargas atómicas parciales, entre otras. Las características globales incluyen características tales como el peso molecular, logP, la superficie polar, varios BCUTs y el volumen molecular (49).

Más recientemente, con el aumento significativo de la potencia de los ordenadores, incluso en PCs de escritorio, los métodos para identificar directamente los rasgos de las moléculas 3D se han vuelto más frecuentes. Las características aquí se refieren generalmente a diversos tipos de campos moleculares, algunos, como la densidad electrónica ("estérica"), otros como los campos potenciales eléctricos (26) y también como campos potenciales lipofílicos (68). Los campos moleculares son generalmente representados como funciones continuas. Los campos discretos también se han utilizado aunque algo menos frecuente (69).

De acuerdo a la naturaleza en su definición y a la complejidad de los rasgos moleculares estructurales que se codifican, los DMs se clasifican de forma general según las dimensiones que abarcan en: DMs-0D (Descriptores Constitucionales), DMs-1D (Descriptores Unidimensionales), DMs-2D (Descriptores Bidimensionales o Invariantes de Grafos), DMs-3D (Descriptores Tridimensionales), y DMs-4D (Descriptores Tetradimensionales).

Los DMs-0D son descriptores que se obtienen directamente de la fórmula molecular y son independientes de cualquier conocimiento sobre la estructura molecular, por ejemplo, el número de átomos (A), el peso molecular (MW), conteo de átomos-tipo (Nx) o cualquier función de las propiedades atómicas. Los DMs-1D están basados en la representación unidimensional de la molécula (o representación que consiste en una lista de fragmentos estructurales de la molécula), aunque no requieren del conocimiento completo de la estructura molecular, tal es el caso de los descriptores de búsqueda y análisis subestructural, como los Descriptores de Conteo de Fragmentos.

Los DMs-2D se basan en la representación bidimensional o *topológica* de la molécula, o sea, que consideran la conectividad de los átomos (vértices) en la molécula (pseudografo) en términos de la presencia y naturaleza de los enlaces químicos (aristas). Los DMs-3D son derivados de la representación tridimensional de la molécula y se basan no solo en la naturaleza y conectividad de los átomos, sino también en la configuración espacial de la molécula.

Finalmente los DMs-4D son descriptores basados no solo en la configuración espacial de la molécula, sino también en los campos escalares de interacción que se originan como consecuencia de la distribución electrónica en dicha entidad química, tales como los Valores de la Energía de Interacción (39).

Tabla 1.- Relación entre la dimensionalidad de los descriptores y la complejidad de la representación que describen.

Dimensión	Representación Típica	Descriptores Típicos	
0D	С9Н8О4	Descriptores constitucionales (e.g., Peso molecular, Conteo de átomos)	
1D	RR — CH ₉	Conteo de grupos funcionales	
2D	OH OCH	Descriptores topológicos	
3D	4	Descriptores geométricos	
4D		Energía de interacción	

Otra clasificación de los DMs que aunque no se menciona explícitamente en los textos quimioinformáticos tiene una importancia trascendental a la hora de aplicar la modelización estadística y/o de aprendizaje automático es la de acorde a la naturaleza numérica de definición de los mismos, esto es, en continuos y discretos. Por ejemplo, la mayoría de los descriptores implementados en el software DRAGON son continuos, las principales excepciones son los bloques constitucionales, donde se pueden encontrar varios descriptores con valores discretos, y todos resultan ser los "contadores" (number of atoms, etc); los bloques de grupos funcionales y fragmentos centrados en átomos, todos son contadores y por ende tienen valores discretos; algunos descriptores de propiedades moleculares, los descriptores tipo-fármacos que comienzan en LAI y terminan en Infective-50 son binarios o booleanos (1/0); las huellas dactilares binarias 2D todas son binarias (1/0); las huellas dactilares de frecuencia 2D, todos tienen valores discretos.

Desde el punto de vista estadístico, de acorde a la fortaleza de la medición de las variables o DMs, estos pueden clasificarse en las escalas de proporción, intervalo, ordinal y categórica (el caso binario para dos categorías). Una práctica común en quimioinformática consiste en transformar descriptores continuos y discretos (proporción/intervalo) en binarios (categórica) a través de un valor de corte como la mediana, o simplemente trabajar con huellas dactilares, para aumentar la eficiencia de los algoritmos de clasificación/predicción; sin embargo, esta práctica también conduce a una pérdida de información estadística que se traduce en la aparición de ataduras en los valores de similitud y disminución de la potencia de las técnicas, resultando además en una menor versatilidad de las mismas (70).

La presentación que se muestra en la Tabla 1 está lejos de ser representativa, por lo que para una presentación detallada los lectores interesados pueden referirse a la última versión del manual de descriptores moleculares de Todeschini y Consonni (2009) donde se trata este tema con profundidad (71). El número de descriptores moleculares propuestos en la literatura hasta el momento es realmente amplio, para ello recientemente se han desarrollado sistemas para el cálculo de grandes conjuntos de descriptores algunos de ellos son el software DRAGON, comercial (72); PaDEL, disponible gratuitamente (73); y MODEL, en plataforma web y disponible gratuitamente (74). Una lista más ampliada de programas para este fin puede encontrarse en el sitio web de la ref. (75).

3.2.3. Selección de rasgos

Actualmente, existe un número realmente grande de descriptores desarrollados que pueden ser usados en los cálculos de similitud (76). Sin embargo, a medida que la dimensionalidad de los datos incrementa, muchos tipos de análisis de datos y problemas de clasificación se vuelven computacionalmente difíciles. En ocasiones, también los datos se vuelven crecientemente dispersos en el espacio que ocupan. Esto puede conducir a grandes problemas para ambos, para el aprendizaje supervisado y no supervisado. En la literatura este fenómeno se refiere como *la maldición de la dimensionalidad* (77). Para propósitos de búsqueda de similitud, el aspecto más relevante de la maldición de la dimensionalidad concierne a la medida de distancia o similitud.

Para ciertas distribuciones de datos, la diferencia relativa entre las distancias de los puntos más cercanos y lejanos a un punto, independientemente seleccionado, tiende a cero a medida que la dimensionalidad aumenta (78). Por otra parte, un número grande de descriptores en la representación pueden contener rasgos irrelevantes o débilmente relevantes, que se conoce afectan negativamente la exactitud de los algoritmos de predicción (79), el caso extremo de este fenómeno se ilustra en *el teorema del patito feo* de Watanabe; basicamente, si uno considera el universo de rasgos de los objetos y no tiene algún sesgo

cognitivo acerca de cuales de ellos son mejores, no importa cuales dos objetos uno compare, todo resultará igualmente similar (disimilar) (80). En este sentido, algunos investigadores de la química medicinal han planteado que no tiene sentido hablar de diversidad sin un sistema de referencia, que está dado en este caso por el ensayo biológico (81). Una estrategia para solucionar esta dificultad es seleccionar un conjunto de descriptores en particular para los cuales se demostró que funcionan bien en un cierto problema. Otra estrategia es calcular primero un gran número de descriptores y luego eliminar aquellos descriptores del conjunto que muestran un coeficiente de correlación por encima de cierto valor. Un enfoque diferente es dejar que la computadora escoja la combinación óptima de descriptores para el problema en cuestión (82).

Numerosos métodos automáticos han sido propuestos en quimioinformática para la selección de rasgos, por ejemplo, la técnica paso a paso de los procesos de integración hacia adelante o eliminación hacia atrás y el análisis de componentes principales (83); también ha sido propuesto el uso de los kvecinos más cercanos (84). Otros métodos de selección más usados en la modelación REA se encuentran la selección secuencial hacia delante (Sequential Feature Forward Selection), la eliminación secuencial hacia atrás (Sequential Feature Backward Elimination), el recocido simulado (Simulated Annaeling) y la selección basada en algoritmos genéticos, siendo esta última una de las más eficientes en el campo de modelación REA (85).

En el pasado, algunos enfoques estaban directamente relacionados con las Redes Neuronales Artificiales, como son: división de los pesos (86), correlación en cascada (87), mapas de Kohonen (88), determinación de la relevancia automática (89), etc. También han sido presentados en la literatura especializada los Sistemas Artificiales de Colonias de Hormigas y Enjambres (90). También ha sido evaluada la eficiencia de algunos algoritmos de poda (91).

En resumen, existe una amplia variedad de descriptores moleculares y métricas usadas en los métodos de similitud molecular; parece ser, sin embargo, que el mejor rendimiento se logra adaptando dicha combinación al problema estudiado (92).

Una fuente excelente que aborda el tema de la selección de rasgos en el contexto del Aprendizaje Automático lo constituye la revisión de Guyon y Elisseeff (93). Un buen número de estas técnicas aparecen implementadas en el software de aprendizaje automático y minería de datos Weka (94), que también puede usarse para la modelización QSAR. Este producto es uno de los más populares en el área del Aprendizaje Automático, es de código abierto y se encuentra disponible gratuitamente (95).

3.2.4. Medidas de similitud

El concepto de similitud es fundamental para varios aspectos del razonamiento y análisis químicos, de hecho, es tal vez la premisa fundamental de la química médica, y cae bajo la rúbrica general de análisis de similitud molecular. La determinación de la similitud de un "objeto molecular" con otro es básicamente un ejercicio de comparación de patrones químicos.

El resultado de este ejercicio es un valor, *la medida de similitud*, que caracteriza el grado de concordancia, de asociación, proximidad, semejanza, alineamiento, porcentaje de identidad o similitud entre pares de moléculas manifestada por sus "patrones moleculares", que se componen de conjuntos de rasgos.

La terminología de "proximidad" a veces se utiliza en un sentido más general para referirse a la similitud, disimilitud, o la distancia entre los pares de moléculas. Las medidas de similitud son funciones que hacen corresponder pares de representaciones moleculares de la misma forma matemática con números reales que usualmente, pero no siempre, yacen en el intervalo unitario [0,1] (61). La similitud es generalmente considerada como una propiedad simétrica, es decir, "A" es tan similar a "B" como "B" a "A", y la mayoría de los estudios se basan en esta propiedad. Tversky (96), sin embargo, ha argumentado persuasivamente que ciertas similitudes son inherentemente asimétricas.

Aunque su trabajo se orientó hacia la psicología, este tiene aplicabilidad además en los estudios de similitud molecular (97). Por otra parte, cuando se aplican los conceptos de similitud y diversidad en química, es necesario definir similitudes globales y locales; las similitudes locales se centran en parte en un objeto (átomo, grupo funcional, las cadenas de proteínas, cadena de ADN, etc.), mientras que las similitudes globales la semejanza se mide entre dos objetos enteros (moléculas, proteínas, etc.) (98).

Consideremos dos objetos químicos arbitrarios A y B descritos mediante vectores X e Y, respectivamente, de n atributos, de modo que X = $(x_1, x_2, x_3, ..., x_n)$.e $Y = (y_1, y_2, y_3, ..., y_n)$. En la Tabla 2 se muestra un grupo de medidas de (di)similitud de amplio uso en quimioinformática extraídas de la revisión de Ellis et al (99). Otro trabajo de revisión excelente sobre medidas de similitud puede encontrarse en (100).

Tabla 2.- Algunas de las medidas de proximidad más usadas en la búsqueda de similitud

Medida	Fórmula ^a	Tipob
Manhattan Media	$MM_{XY} = \frac{\sum_{j=1}^{n} \left x_j - y_j \right }{n}$	D
Euclidiana Media	$EM_{XY} = \frac{\sqrt{\sum_{j=1}^{n} \left x_j - y_j \right ^2}}{n}$	D
Bray/Curtis	$BC_{XY} = \frac{\sum_{j=1}^{n} x_j - y_j }{\sum_{j=1}^{n} (x_j + y_j)}$	D
Tan	$T_{XY} = \frac{\sum_{j=1}^{n} x_j y_j}{\sum_{j=1}^{n} x_j^2 + \sum_{j=1}^{n} y_j^2 - \sum_{j=1}^{n} x_j y_j}$	A
Dice	$D_{XY} = \frac{2\sum_{j=1}^{n} x_j y_j}{\sum_{j=1}^{n} x_j^2 + \sum_{j=1}^{n} y_j^2}$	A
Sokal/Sneath(1)	$SS1_{XY} = \frac{\sum_{j=1}^{n} x_j y_j}{2\sum_{j=1}^{n} x_j^2 + 2\sum_{j=1}^{n} y_j^2 - 3\sum_{j=1}^{n} x_j y_j}$	A
Cosine/Ochiai	$Cos_{XY} = \frac{\sum_{j=1}^{n} x_{j} y_{j}}{\sqrt{\sum_{j=1}^{n} x_{j}^{2} \sum_{j=1}^{n} y_{j}^{2}}}$	A
Pearson	$r_{XY} = \frac{\sum_{j=1}^{n} (x_j - \overline{X})(y_j - \overline{Y})}{\sqrt{\sum_{j=1}^{n} (x_j - \overline{X})^2 \sum_{j=1}^{n} (y_j - \overline{Y})^2}}$	С

 $[^]a$ xj (y_j) representa el valor del descriptor del vector \mathbf{X} (A) e \mathbf{Y} (B) en el atributo j; b Clasificación de las medidas de proximidad acorde a su naturaleza de definición. D, coeficientes de distancia: están basados en la suma de diferencias, sus valores varían en proporción inversa con el grado de similitud; A, coeficientes de asociación: se basan en el producto interno, y sus valores varían en proporción directa con el grado de similitud, por lo que una mayor similitud se indica por el aumento de los valores; C, coeficientes de correlación: Los coeficientes de correlación se basan en una tercera función más compleja: la suma de los productos de la diferencias entre cada valoratributo y la media de todos los valores de los atributos de cada uno de los dos vectores. Los valores de estos por lo general varían de 1 (lo que indica que cualquier cambio en los atributos de un objeto sería acompañado por un cambio idéntico en los atributos del otro) a -1 (que indica que un cambio en uno y sería acompañado por un cambio igual y opuesto en el otro).

Cuando los valores de atributo se limitan a 0 y 1, las expresiones utilizadas por varias similitudes y medidas de distancia pueden a menudo ser simplificadas considerablemente. Si los objetos A y B que se caracterizan por vectores $\textbf{\textit{X}}$ e $\textbf{\textit{Y}}$ que contienen n valores binarios (tales como huellas digitales) se pueden definir las cantidades a, b, c, d o elementos de la matriz de confusión como:

$$a = \sum_{j=1}^{n} x_{j}$$
, es el número de bits activos en A

(1)

$$b = \sum_{i=1}^{n} y_i$$
, es el número de bits activos en B

(2)

$$c = \sum_{j=1}^{n} x_j y_j$$
, es el número de bits activos en A y B

(3)

$$d = \sum_{j=1}^{n} (1 - x_j - y_j + x_j y_j)$$
, es el número de bits inactivos en A y B

(4)

Por tanto,
$$n = a + b - c + d$$

(5)

Estas cantidades anteriores también se pueden expresar en notación de teoría de conjuntos dando lugar a otras formulaciones basadas en este tipo de representación (101).

Como ejemplo ilustrativo tenemos el coeficiente de Tanimoto para el caso binario dado por:

$$T_{XY} = c/[a+b-c]$$
 (6)

Este coeficiente aplicado a las huellas dactilares 2D constituye actualmente la medida de elección de los sistemas de software comerciales para la gestión de la información química. También forma parte de sistemas de acceso público importantes como el PubChem (50).

En un artículo revisión reciente Willet (2006) resume los resultados de los estudios de comparación y combinación de coeficientes de similitud usando huellas dactilares en conjuntos de datos apropiados. Estos resultados muestran que algunos coeficientes se comportan monotónicamente entre sí, lo que significa que producen clasificaciones u ordenamientos idénticos o muy similares de los compuestos de la base de datos frente a una estructura de referencia determinada, a pesar de que los valores del coeficiente real son diferentes. También se ha mostrado que algunos coeficientes tienen una marcada preferencia a funcionar bien en la búsqueda de moléculas activas de un tamaño determinado dado aproximadamente por el número de bits activos en el vector de representación; por ejemplo, el coeficiente de Russel-Rao "muestra preferencia" por moléculas

bioactivas de tamaño relativamente grande, el coeficiente de Tanimoto por moléculas bioactivas de tamaño mediano y el coeficiente de Forbes por moléculas bioactivas de tamaño pequeño (102).

Aún cuando el coeficiente de Tanimoto continua siendo la medida de similitud estándar en la industria y se ha usado en innumerables trabajos de investigación, la evidencia indica que ningún modelo de proximidad es universalmente superior a los demás, sino que su utilidad práctica depende del problema o grupo de problemas a tratado (92). Esta conclusión parece estar de acorde a la dialéctica resultante de la complementación de los teoremas *Ningún Almuerzo es Gratis* (NFL, del inglés No Free Lunch) (103, 104), y la *Longitud Mínima de la Descripción* [MDL del inglés Minimun Description Length] (105), correspondientemente.

3.3. Algoritmos de emparejamiento o "matching"

El concepto de emparejamiento "match" exacto y parcial, y los algoritmos de búsqueda de emparejamiento son ampliamente utilizados en sistemas de información química basados en ordenadores con el fin de buscar una subestructura idéntica. Una facilidad menos común es la provisión para la búsqueda del mejor par, o vecino más cercano, en la cual se recupera la estructura(s) más similar a una estructura de consulta, donde la similitud se define sobre la base de alguna función de coeficiente de similitud o de distancia que refleja el número de fragmentos comunes de la consulta y de una molécula en el fichero. La búsqueda del mejor par es la base para la clasificación del *k-(ésimo) vecino más cercano* (kNN, del inglés *k-*Nearest Neighbor) y juega un papel importante en el uso de árboles de expansión y técnicas de clasificación automática (106).

El problema general de encontrar las mejores pares se define por Friedman et al. (107) como: "... dado un fichero de m instancias (cada uno de los cuales es descrito por n atributos con valores reales) y una medida de similitud/disimilitud, encontrar las k instancias más cercanas a la instancia de consulta (es posible que no esté dentro del fichero) con los atributos especificados". Es obvio que el algoritmo de fuerza bruta para la búsqueda del mejor par es calcular la distancia entre la consulta y cada uno de las instancias del fichero y luego elegir las m distancias más cortas, este algoritmo tiene una complejidad temporal O(mn) para el caso de una consulta simple, pero en el caso de consulta múltiple sería un O(mnc), siendo c el número de consultas con igual cantidad de atributos n, el cual consume demasiado tiempo para ficheros considerablemente grandes.

Un algoritmo eficiente del vecino más cercano será uno que evite el cálculo de la mayoría de las distancias, calculando solamente las distancias de las escasas instancias que rodean la instancia o estructura de consulta. Existen varios tipos de

criterios para reducir el número de cálculos necesarios, incluyendo la proyección de las instancias d-dimensionales en un espacio de dimensión menor, de forma tal que varias instancias puedan ser buscadas, o eliminadas desde una búsqueda, simultáneamente (108). En este sentido, varios de los algoritmos reportados pueden no ser directamente aplicables a la búsqueda de los mejores pares en contextos químicos ya que los primeros asumen que los atributos son variables continuas, mientras que las estructuras químicas son descritas frecuentemente por fragmentos de ocurrencia binaria. En estos casos, cada una de las estructuras en un archivo se representa por una cadena de bits en el que se establece el bit i-ésimo si el fragmento correspondiente está presente en la estructura. Además, a menudo se supone que las instancias se encuentran en un espacio de dimensión d pequeña, por lo general 2 o 3; sin embargo, para el caso de la representación química binaria, d puede ser del orden de 10^2 o 10^3 (el número de bits en la cadena de bits), y por ende estos algoritmos resultan ser poco factibles. Por ejemplo, el procedimiento *O(nlog N)* debido a Friedman et al. (1977) implica una constante de proporcionalidad alrededor de 1.6^d (107), mientras que el método de búsqueda de Bentley et a1. (1980) implica la inspección de todas las 3^d - 1 celdas advacentes a una celda dada en un espacio *d*-dimensional (108).

Alternativamente, otros investigadores han centrado su atención en los algoritmos de búsqueda basados en la representación binaria. Smeaton y Van Rijsbergen (1981) tienen en cuenta que un *archivo invertido* puede ser utilizado para aumentar la eficiencia de la búsqueda de emparejamiento a una consulta en documentos donde tiene al menos un término en común. A partir de aquí, estos autores describen experimentos usando un procedimiento de *límite superior* que permite que la búsqueda de la mejor pareja se termine antes de que todos los documentos en la lista de los ficheros invertidos correspondientes a la consulta hayan sido inspeccionados (109). Murtagh (1982) describe una extensión de este algoritmo en el que son calculados otros límites superiores, posibilitando una mayor reducción en el número de documentos que necesitan ser comparados con una consulta (110).

Van Marlen y Van den Hende (1979), y Rasmussen et al. (1979) han descrito algoritmos de recuperación de las mejores parejas para el uso de ficheros informáticos con espectros de masa, donde la estructura es caracterizada por una cadena de bits correspondientes a los picos observados en el espectro de masa molecular (111, 112), mientras que otros autores han estudiado la búsqueda del mejor emparejamiento en los sistemas de recuperación de información molecular (106).

Baldi et al. (2008) plantean un algoritmo diferente a los demás, el cual consiste en almacenar para cada molécula A de la base de datos, no solamente su vector correspondiente \vec{A} sino también almacenar información adicional contenida

en un pequeño vector \vec{a} , de tamaño n siendo n potencia de 2 (esto es, si \vec{A} tiene tamaño $N=2^p$ entonces el tamaño de \vec{a} es n=p). El vector \vec{a} se obtiene aplicando el operador XOR (eXclusive OR, del inglés) al vector \vec{A} . Esta información adicional puede ser vista como una guía que precede al vector \vec{A} , la cual puede ser usada para derivar los límites útiles en las medidas de similitud lo cual permite explorar menos del 50% de la base de datos y acelera la búsqueda significativamente (113). Más recientemente, Cao et al. (2010) han reportado un algoritmo de búsqueda y agrupamiento acelerado basado en técnicas de empotramiento e indexado multidimensional que mejora en 20-400 veces a los métodos secuenciales en cuanto al tiempo de búsqueda de los 100 primeros vecinos más cercanos (el algoritmo de Baldi et al. (2008) los mejora en 5.5 veces) en conjuntos de datos de 260 000-19 millones de compuestos, mientras que mantiene exactitudes comparables. Además, este algoritmo es aplicable a un amplio espectro de medidas de similitud y puede ser escalable a conjuntos de datos de hasta cientos de millones de objetos químicos (114).

3.4. Fusión de datos

La fusión de datos se utilizó por primera vez en la búsqueda de similitud a finales de los años noventa (115,116). Básicamente, existen tres técnicas de fusión de datos y una de estas es la *fusión de similitud*, que implica la búsqueda con una estructura de referencia y varias medidas de similitud. Otra variante es la fusión de grupo, que consiste en buscar múltiples estructuras de referencia con una sola medida de similitud y se ha mostrado que es más eficaz que la fusión de similitud. El tercer enfoque es la turbo similitud, en analogía a los motores turbos que reutilizan los gases de escape y le imprimen una potencia mayor al vehículo; esta técnica utiliza una estructura de referencia y una medida de similitud, sin embargo, es más efectiva que la búsqueda simple porque utiliza los primeros vecinos más cercanos recuperados como estructuras de referencias, ya que estos es probable que también sean bioactivos y al mismo tiempo introducen otros rasgos estructurales que aumentan el éxito de la búsqueda al encontrar otros quimiotipos en el espacio químico (48). Actualmente, las nuevas técnicas de búsqueda de similitud son validadas usando la técnica fusión de datos embebida en algún mecanismo de validación cruzada. Para ello, una vez obtenidas las listas de recuperación como producto de aplicar las multi consultas, es necesario combinar dicha información para derivar un puntaje fusionado y útil para cada molécula del repositorio que permita el ordenamiento final del conjunto de datos. En este sentido Hert et al. (2004) introdujeron la regla de fusión MAX-SIM (máxima similitud) que por su probada alta efectividad se ha usado durante varios años como el multi clasificador de facto para los estudios quimioinformáticos por su eficacia y simplicidad matemática y computacional en el cribado de conjunto de datos farmacológicos (117, 118). Básicamente, el algoritmo MAX-SIM es uno de los

métodos más simples para el cribado virtual por el cual una molécula es punteada con su similitud más alta a una molécula activa de la multi consulta. Formalmente, si una consulta múltiple de activos es denotada por $\{x_1, x_2, ..., x_q\}$, el puntaje asignado a una molécula del conjunto de datos x_n viene dado por:

$$z_1(x_n) = \max_{1}^{q} \{ S(x_n, x_i) \}$$
(7)

Donde, $S(x_n, x_i)$ es la similitud de la molécula del conjunto de datos x_n a la referencia x_i de la multi consulta, S es la función de similitud y algunas de ellos han demostrado ser eficaces en la operación. Sin embargo, en un estudio abarcador Chen et al. (2010) mostraron recientemente que la regla "suma de rangos inversos" se comporta superiormente a la regla MAX-SIM en los dominios de datos examinados, esto es:

$$z_2(x_n) = \sum_{i=1}^q 1/r[S(x_n, x_i)]$$
(8)

Donde, r es el "ranking" asignado al puntaje de similitud $S(x_n,x_i)$, relativo a los puntajes de las moléculas del conjunto con respecto a una consulta especifica.

Esta regla de fusión procede del área de Recuperación de Información y su efectividad se debe a la cercana relación que existe entre el rango reciproco de la estructura de la base de datos con respecto a una búsqueda de similitud simple y la probabilidad de que esta estructura comparta la misma actividad que la estructura de referencia (119).

Como alternativa a las técnicas de fusión de datos anteriores, algunos investigadores han trabajado la ponderación de rasgos binarios orientados por clases de actividad sobre la base de compuestos de referencia múltiples y aplicados para enfatizar algunas posiciones de bits específicas durante la búsqueda de similitud. Algunas técnicas de ponderación de rasgos se basan en el análisis de frecuencia de bits en huellas dactilares o "fingerprints" de molecular activas y/o inactivas, perfilando, escalando y promediando los fingerprints para derivar en el cálculo de los fingerprints de consenso. Un grupo de técnicas más reciente se basan en el acallado de bits "bit silencing" y difiere de los enfoques estadísticos en que monitorean directamente el cambio en la calidad de la recuperación cuando se omiten bits individuales en moléculas de referencia activas (120). En esencia, estas técnicas también pudieran considerarse como una cuarta estrategia de fusión de datos, más específicamente fusión de representación, y, actualmente constituyen un área de investigación activa por la facilidad con que pueden calcularse, manipularse y almacenarse los descriptores binarios. Por otra parte, estas técnicas también pueden ser extendidas al caso no binario.

3.5. Métricas de desempeño

Existe un debate en curso en la literatura sobre "puntajes de mérito" adecuados (o indicadores de desempeño) para evaluar los ensayos de cribado virtual retrospectivos. Una métrica popular es el "factor de enriquecimiento", que es intuitivo y sencillo de interpretar. Un problema asociado con el cálculo de los factores de enriquecimiento simples es la dependencia de un valor de corte elegido, por lo general el 1 o 5% de la base de datos para cribado. Nicholls (2008) aboga firmemente por el uso de medidas estándares, incluyendo la curva de la Característica en Operación del Receptor (ROC, del inglés Receiver Operating Characteristics) y el área bajo la curva AUC[ROC] (121), que se aplican habitualmente en otros campos que emplean el análisis estadístico, minería de datos, o las técnicas de aprendizaje automático (122). Sin embargo, Truchon y Bayly (2007) detectaron que la curva ROC no tiene en cuenta explícitamente el llamado "problema de la detección temprana", i.e., la propiedad de un método para recuperar compuestos activos "tempranamente", i.e., al principio de la lista de clasificación. Específicamente, este fenómeno es ejemplificado en tres situaciones donde el algoritmo de búsqueda: 1-) ranquea la mitad de los candidatos positivos al principio de la lista y la mitad al final, 2-) distribuye los candidatos positivos uniformemente por toda la lista, 3-) ranquea todos los candidatos positivos exactamente en la mitad de la lista. Para todos los casos anteriores AUC[ROC] = 0.5 aunque, si solo algunos pocos primeros hits pueden ser probados experimentalmente, el caso 1-) es claramente mejor que el caso 2-) que, a su vez, es mejor que el caso 3-). En este sentido, los autores desarrollaron un mejoramiento de la curva ROC a través de la métrica Discriminación Mejorada por (la distribución de) Boltzmann de la ROC (BEDROC, del inglés Boltzmann-Enhanced Discrimination of ROC), que utiliza una ponderación exponencial para asignar mayor peso a la detección temprana (123). Esta medida es esencialmente una versión normalizada de la medida Mejora Inicial Robusta (RIE, del inglés Robust Initial Enhancement) (124). Del mismo modo, se ha sugerido el escalado semilogarítmico de la ROC, pROC (125). Sin embargo, Nicholls (2008) también presenta evidencias de una fuerte correlación entre el AUC[ROC] y AUC[BEDROC], lo que sugiere a AUC[ROC] como una medida suficiente para evaluar la eficiencia de cribado virtual. Este mismo autor recomienda se aplique un ponderado exponencial a la curva ROC preferentemente a los rangos individuales de los compuestos activos dentro de los inactivos para mejorar algunas de las deficiencias de las métricas AUC[RIE] y AUC[BEDROC] (121).

3.5.1. Curva ROC concentrada

Basados en la idea de Nicholls (2008), aunque no lo citan explícitamente, Swamidass et al. (2010) proponen la curva ROC Concentrada (CROC, del inglés Concentrated ROC) que consiste en magnificar uno de los ejes de la curva ROC [X

representa la razón de falsos positivos (fpr) e Y representa la razón de verdaderos positivos (tpr)] a través de una transformación de magnificación suave ya sea exponencial, de potencia o logarítmica. La lógica de su trabajo se basa en el "comportamiento del usuario" que se observa en la recuperación de páginas web donde se conoce, como promedio, la frecuencia con que el primero, segundo, ..., nésimo registro son pinchados ("cliqueados"); la curva decreciente correspondiente de cuán relevante es cada rango provee información valiosa para los niveles de intervalo y magnificación requeridos; a partir de aquí es razonable requerir que el factor de magnificación local sea proporcional a la relevancia correspondiente. Por la analogía de estos sistemas con los sistemas de recuperación en el de descubrimiento fármacos, se propone se emplee una relevancia exponencialmente decreciente del "ranqueo" final. Finalmente, a través de resultados gráficos y empleando pruebas estadísticas robustas los autores concluyen que las variantes CROC son más potentes que los métodos de umbrales de corte fijo, que las variantes Curva de Acumulación Concentrada (CAC, del inglés Concentrated Acumulation Curve), pROC y ROC (126).

La variante más potente de la curva CROC se obtiene aplicando una transformación de magnificación exponencial del eje X (fpr) de la curva ROC dada por:

$$h(x) = \frac{1 - e^{-\alpha x}}{1 - e^{-\alpha}}$$

(9)

Donde, α es el factor de magnificación, que para caso recomendado toma el valor α = 20 que corresponde aproximadamente a un 8% de enriquecimiento temprano (123).

Una vez establecida la función de magnificación h(x), el área bajo la curva CROC puede calcularse fácilmente como el promedio de los valores de fpr transformados correspondientes a las posiciones de las instancias positivas en la lista de recuperación como:

$$AUC[CROC] = \frac{\sum_{i=1}^{n} [1 - h(fpr_i)]}{n}$$
(10)

Donde, fpr_i es la razón de falsos positivos al nivel (rango) de cada instancia positiva i del total n.

Por último, valores del área bajo CROC se pueden comparar con el valor correspondiente al clasificador aleatorio a través de la formula:

$$AUC[CROC]_{aleat} = \frac{1}{\alpha} - \frac{e^{-\alpha}}{1 - e^{-\alpha}}$$
(11)

Donde, $\alpha=20$ la métrica del clasificador aleatorio toma el valor $AUC[CROC]_{aleat}=0.2809$

4. CONCLUSIONES

El proceso tradicional de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es muy costoso en términos de recursos materiales y de tiempo. Una alternativa viable y complementaria a este paradigma es el método de cribado virtual in silico, cuya esencia radica en manipular de forma racional en términos explicativos, de diseño y predictivos el gran volumen de información procedente del cribado de alto rendimiento y quimiotecas virtuales. Una de las técnicas que resaltan por su alta eficiencia y comprobada efectividad es la búsqueda de similitud, que contando solamente con un ordenador potente, un conjunto de datos químicos in silico, una medida de similitud, un algoritmo de emparejamiento e información acerca de una única molécula bioactiva de consulta, o al menos unos pocos rasgos estructurales de interés, es capaz de recuperar las moléculas más parecidas a la referencia, que a su vez tienen la mayor probabilidad de exhibir la bioactividad estudiada. El panorama actual brinda una magnífica oportunidad para el uso y explotación de estas técnicas en la solución de problemas de la química medicinal ya que, al igual que en el caso de la bioinformática, los recursos quimioinformáticos siguen pasando aceleradamente al dominio público. A pesar de ello, se debe seguir velando por la rigurosidad y calidad de los modelos y soluciones puesto que los productos finales serán usados en humanos, demás animales, plantas y el medio ambiente en general. Para validar y usar nuevas técnicas (nuevos descriptores, medidas de similitud, algoritmos de búsqueda) recomendamos usar conjuntos de datos no sesgados, curados y representativos del contexto bioactivo a investigar; usar representaciones moleculares eficientes pero informativas; usar técnicas de selección de rasgos (automática) cada vez que sea posible y usar estos rasgos seleccionados en las búsquedas "no supervisadas" de otros repositorios grandes; emplear validación cruzada, cuando sea apropiado, para obtener un estimado promedio del desempeño en las distintas regiones del espacio de entrenamiento, y finalmente, comprobar la calidad de las predicciones a través de evaluaciones experimentales de la actividad in vitro e in vivo. Esperamos que en los años venideros, con la disponibilidad de mayores recursos virtuales gratuitos, un mayor grado en la comprensión del enigma encantador de la similitud molecular y los mapas de similitud, y contando con algoritmos de búsqueda eficientes y ordenadores veloces, seremos capaces de adentrarnos cada vez más en el "espacio astronómico químico" descubriendo otras "galaxias de compuestos líderes" y aportando soluciones eficaces en términos de entidades farmacológicas noveles en favor de una mayor calidad de vida y longevidad del ser humano.

5. AGRADECIMIENTOS

El primer autor (O.M.R.B.) quisiera agradecer a sus colegas y amigos Noel Ferro, de la Universidad de Hannover (Alemania); Nelaine Mora-Diez, de la Universidad Thomson Rivers (Canadá) y Lourdes Casas-Cardoso, de la Universidad de Cádiz (España) por proveerle gentilmente con materiales bibliográficos útiles. También, quisiera reconocer el trabajo altamente eficiente del consejo editorial científico de la revista Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Esta investigación fue financiada parcialmente por el Programa de Colaboración entre la UCLV y la institución belga VLIR-IUS. El programa de becas entre la Universidad Autónoma de Madrid y la UCLV también financió parte de esta investigación.

6. REFERENCIAS

- 1. Drews, J. Drug discovery: A historical perspective. *Science* **2000**, *287*, 1960.
- 2. Kubinyi, H. Strategies and recent technologies in drug discovery. Pharmazie 1995, 50, 647.
- 3. Chanda, S.; & Caldwell, J. Fulfilling the promise: Drug discovery in the postgenomic era. *Drug Discov Today* **2003**, *8*, 168.
- 4. Ren, J.; & Stammers, D. HIV reverse transcriptase structures: Designing new inhibitors and understanding mechanisms of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* **2005**, *26*, 4.
- 5. Manly, C.; Louise-May, S.; & Hammer, J. The impact of informatics and computational chemistry on synthesis and screening. *Drug Discov Today* **2001**, *6*, 1101.
- 6. Jorgensen, W. The many roles of computation in drug discovery. Science 2004, 303, 1813.
- 7. Xu, J.; & Hagler, A. Chemoinformatics and drug discovery. *Molecules* **2002**, *7*, 566.
- 8. Boobis, A.; Gundert-Remy, U.; Kremers, P.; Macheras, P.; & Pelkonen, O. In silico prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COST B15. *Eur J Pharm Sci* **2002**, *17*, 183.
- 9. Ekins, S.; Boulanger, B.; Swaan, P.; & Hupcey, M. Towards a new age of virtual ADME/TOX and multidimensional drug discovery. *J Comput Aided Mol Des* **2002**, *16*, 381.
- 10. Bleicher, K.; Bohm, H.; Muller, K.; & Alanine, A. Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 369.
- 11. DiMasi, J.; Hansen, R.; & Grabowski, H. The price of innovation: New estimates of drug development costs. *J Health Econ* **2003**, *22*, 151.
- 12. Cruz-Monteagudo, M.; Borges, F.; & Cordeiro, M. N. D. S. Jointly handling potency and toxicity of antimicrobial peptidomimetics by simple rules from desirability theory and chemoinformatics. *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 3060.
- 13. Tollman, P.; Guy, P.; Altshuler, J.; Flanagan, A.; & Steiner, M. *Revolution in R&D, How Genomics and Genetics are Transforming the Biopharmaceutical Industry*; Group, B. C.; Massachusetts, 2001.
- 14. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 882.
- 15. Lazo, J.; & Wipf, P. Combinatorial chemistry and contemporary pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, *293*, 705.
- 16. Chen, W. L. Chemoinformatics: past, present, and future. J Chem Inf Model 2006, 46, 2230.
- 17. Gasteiger, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *384*, 57.
- 18. Warr, W. A. Some trends in chem (o) informatics. *Methods Mol Biol* **2011**, 672, 1.
- 19. Reddy, A. S.; Pati, S. P.; Kumar, P. P.; Pradeep, H.; & Sastry, G. N. Virtual screening in drug discovery-A computational perspective. *Curr Protein Pept Sc* **2007**, *8*, 329.
- 20. Seifert, M. H. J.; Wolf, K.; & Vitt, D. Virtual high-throughput in silico screening. *Biosilico* **2003**, *1*, 143.
- 21. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discovery* **2002**, *1*, 882.

- 22. Scior, T.; Bender, A.; Tresadern, G.; Medina-Franco, J. L.; Martínez-Mayorga, K.; Langer, T.; Cuanalo-Contreras, K.; & Agrafiotis, D. K. Recognizing pitfalls in virtual screening: A critical review. *J Chem Inf Model* **2012**, *52* 867–881.
- 23. Willett, P. In *Chemoinformatics: concepts, methods, and tools for drug discovery*; Bajorath, J., Ed.; Humana Press; Totowa, New Jersey, 2004; p 51.
- 24. Agrafiotis, D. K. Diversity of chemical libraries. *ECC* **1998**, *1*, 742.
- 25. Taylor, R. Simulation analysis of experimental design strategies for screening random compounds as potential new drugs and agrochemicals. *J Chem Inf Comput Sci* **1995**, *35*, 59.
- 26. Bayada, D. M.; Hamersma, H.; & Van Geerestein, V. J. Molecular diversity and representativity in chemical databases. *J Chem Inf Comput Sci* **1999**, *39*, 1.
- 27. Rivera-Borroto, O. M.; Marrero-Ponce, Y.; García-de la Vega, J. M.; & Grau-Ábalo, R. d. C. Comparison of combinatorial clustering methods on pharmacological data sets represented by machine learning-selected real molecular descriptors. *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 3036.
- 28. Rivera-Borroto, O. M.; Rabassa-Gutiérrez, M.; Grau-Ábalo, R. d. C.; Marrero-Ponce, Y.; & García-de la Vega, J. M. Dunn's index for cluster tendency assessment of pharmacological data sets. *Can J Physiol Pharmacol* **2012**, *90*, 425.
- 29. Doweyko, A. QSAR: Dead or alive? J Comput -Aided Mol Des 2008, 22, 81.
- 30. Deardena, J. C.; Cronina, M. T. D.; & Kaiserb, K. L. E. How not to develop a quantitative structure–activity or structure–property relationship (QSAR/QSPR). *SAR QSAR Environ Res* **2009**, *20*, 241.
- 31. Marrero-Ponce, Y.; Meneses-Marcel, A.; Rivera-Borroto, O. M.; García-Domenech, R.; De Julián-Ortiz, J. V.; Montero, A.; Escario, J. A.; Barrio, A. G.; Pereira, D. M.; & Nogal, J. J. Bondbased linear indices in QSAR: Computational discovery of novel anti-trichomonal compounds. *J Comput -Aided Mol Des* **2008**, *22*, 523.
- 32. Meneses-Marcel, A.; Rivera-Borroto, O. M.; Marrero-Ponce, Y.; Montero, A.; Tugores, Y. M.; Escario, J. A.; Barrio, A. G.; Pereira, D. M.; Nogal, J. J.; & Kouznetsov, V. V. New antitrichomonal drug-like chemicals selected by bond (edge)-based TOMOCOMD-CARDD descriptors. *J Biomol Screening* **2008**, *13*, 785.
- 33. Rivera-Borroto, O. M.; Marrero-Ponce, Y.; Meneses-Marcel, A.; Escario, J. A.; Gómez Barrio, A.; Arán, V. J.; Martins Alho, M. A.; Montero Pereira, D.; Nogal, J. J.; & Torrens, F. Discovery of novel trichomonacidals using LDA-driven QSAR models and bond-based bilinear indices as molecular descriptors. *QSAR Comb Sci* **2009**, *28*, 9.
- 34. Campillo, N. E.; González-Naranjo, P.; & Páez, J. A. Presente y futuro en el descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Chagas. *An R Acad Nac Farm* **2012**. *78*, 34.
- 35. Wu, X.; Kumar, V.; Ross Quinlan, J.; Ghosh, J.; Yang, Q.; Motoda, H.; McLachlan, G. J.; Ng, A.; Liu, B.; & Yu, P. S. Top 10 algorithms in data mining. *Knowl Inf Syst* **2008**, *14*, 1.
- 36. Johnson, M. A.; & Maggiora, G. M. *Concepts and applications of molecular similarity*; Wiley; New York, 1990.
- 37. Hofstadter, D. In *The analogical mind: Perspectives from cognitive science*; Gentner, D., Ed.; The MIT Press; Cambridge, Massachusetts, 2001; p 541.
- 38. Martin, Y. C.; Kofron, J. L.; & Traphagen, L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J Med Chem* **2002**, *45*, 4350.
- 39. Maldonado, A. G.; Doucet, J. P.; Petitjean, M.; & Fan, B.-T. Molecular similarity and diversity in chemoinformatics: From theory to applications. *Mol Div* **2006**, *10*, 39.
- 40. Maggiora, G.; & Shanmugasundaram, V. In *Chemoinformatics and Computational Chemical Biology*; Bajorath, J., Ed.; Humana Press; New York, 2011; p 77.
- 41. Willett, P. Searching techniques for databases of two- and three-dimensional chemical structures. *J Med Chem* **2005**, *48*, 4183.
- 42. Willett, P. Chemoinformatics-similarity and diversity in chemical libraries. *Curr Opin Biotechnol* **2000**, *11*, 85.
- 43. Stumpfe, D.; & Bajorath, J. Exploring activity cliffs in medicinal chemistry. *J Med Chem* **2012**.
- 44. Bajorath, J.; Li, R.; Stumpfe, D.; Vogt, M.; & Geppert, H. C. Development of a method to consistently quantify the structural distance between scaffolds and to assess scaffold hopping potential. *J Chem Inf Model* **2011**.
- 45. Willett, P. Similarity methods in chemoinformatics. Annu Rev Inf Sci Technol 2009, 43, 1.

- 46. Rivera Borroto, O. M.; Hernández Díaz, Y.; García de la Vega, J. M.; Grau Ábalo, R. d. C.; & Marrero Ponce, Y. Novel similarity measures for the effective and efficient retrieval of pharmacological data sets. *Afinidad* **2011**, *68*, 50.
- 47. Sheridan, R. P.; & Kearsley, S. K. Why do we need so many chemical similarity search methods? *Drug Discov Today* **2002**, *7*, 903.
- 48. Willett, P. Data fusion in ligand-based virtual screening. QSAR Comb Sci 2006, 25, 1143.
- 49. Brown, R. D. Descriptors for diversity analysis. Perspect Drug Disc Design 1997, 7, 31.
- 50. National Center for Biotechnology Information. PubChem. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 51. National Institutes of Health. National Cancer Institute. https://resresources.nci.nih.gov/resources/ (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 52. The Cheminformatics and QSAR Society. http://www.qsar.org (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 53. International Academy of Mathematical Chemistry. http://www.iamc-online.org/ (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 54. Daylight Chemical Information Systems. WDI. http://www.daylight.com (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 55. Sunset Molecular Discovery. WOMBAT. http://sunsetmolecular.com (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 56. Baykoucheva, S. A new era in chemical information: PubChem, DiscoveryGate, and Chemistry Central. *Online* **2007**, *31 Issue*, *p16*, 16.
- 57. Bender, A. Compound bioactivities go public. *Nature Chem Biol* **2010** *6*, 309.
- 58. Rohrer, S. G.; & Baumann, K. Maximum unbiased validation (MUV) data sets for virtual screening based on PubChem bioactivity data. *J Chem Inf Model* **2009**, *49*, 169.
- 59. Fourches, D.; Muratov, E.; & Tropsha, A. Trust, But Verify: On the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *J Chem Inf Model* **2010**, *50*, 1189.
- 60. Johnson, M. A. A review and examination of mathematical spaces underlying molecular similarity analysis. *J Math Chem* **1989** *3*, 117.
- 61. Maggiora, G. M.; & Shanmugasundaram, V. In *Chemoinformatics*; Bajorath, J., Ed.; Humana Press; 2004; p 1.
- 62. Agrafiotis, D. K.; Bandyopadhyay, D.; Wegner, J. K.; & van Vlijmen, H. Recent advances in chemoinformatics. *J Chem Inf Model* **2007**, *47*, 1279.
- 63. Wegner, J. K.; Fröhlich, H.; Mielenz, H. M.; & Zell, A. Data and graph mining in chemical space for ADME and activity data sets. *QSAR Comb Sci* **2006**, *25*, 205.
- 64. Cuissart, B.; Touffet, F.; Cremilleux, B.; Bureau, R.; & Rault, S. The maximum common substructure as a molecular depiction in a supervised classification context: experiments in quantitative structure/biodegradability relationships. *J Chem Inf Comput Sci* **2002**, *42*, 1043.
- 65. Adamson, G. W.; & Bush, J. A. A method for the automatic classification of chemical structures. *Inf Stor Retriev* **1973**, *9*, 561.
- 66. Willett, P.; & Winterman, V. A comparison of some measures for the determination of inter-molecular structural similarity. *Quant Struct-Activ Relat* **1986**, *5*, 18.
- 67. Brown, R. D.; & Martin, Y. C. Use of structure-activity data to compare structure-based clustering methods and descriptors for use in compound selection. *J Chem Inf Comput Sci* **1996**, *36*, 572.
- 68. Matter, H.; & Potter, T. Comparing 3D pharmacophore triplets and 2D fingerprints for selecting diverse compound subsets. *J Chem Inf Comput Sci* **1999**, *39*, 1211.
- 69. Patterson, D. E.; Cramer, R. D.; Ferguson, A. M.; Clark, R. D.; & Weinberger, L. E. Neighbourhood behaviour: A useful concept for validation of "molecular diversity" descriptors. *J Med Chem* **1996**, *39*, 3049.
- 70. Siegel, S.; & Castellan, N. J. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*; McGraw-Hill; New York, USA, 1988.
- 71. Todeschini, R.; & Consonni, V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*; 2nd ed.; WILEY-VHC; Weinheim, Germany, 2009.
- 72. DRAGON for Windows 5.5; Milano, Italy, 2007. Este software se encuentra disponible en: http://www.talete.mi.it (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 73. PaDEL-Descriptor, 1.0; Singapore, 2010. Este software se encuentra disponible en: http://padel.nus.edu.sg/software/padeldescriptor (visitado el 1 de octubre de 2013).

- 74. Li, Z.; Han, L.; Xue, Y.; Yap, C.; Li, H.; Jiang, L.; & Chen, Y. MODEL—molecular descriptor lab: A web-based server for computing structural and physicochemical features of compounds. *Biotechnol Bioeng* **2007**, *97*, 389. Este software se encuentra disponible en: http://jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/model/model.cgi (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 75. Molecular descriptors: The free online resource. http://www.moleculardescriptors.eu/index.htm (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 76. Bender, A.; & Glen, R. C. Molecular similarity: A key technique in molecular informatics. *Org Biomol Chem* **2004**, *2*, 3204.
- 77. Janecek, A.; Gansterer, W.; Demel, M.; & Ecker, G. In *Proceedings of the Workshop on New Challenges for Feature Selection in Data Mining and Knowledge Discovery (FSDM 2008)*; Saeys, Y., Liu, H., Inza, I., Wehenkel, L., Van de Peer, Y., Eds.; JMLR: Workshop and Conference Proceedings; Antwerp, Belgium, 2008; p 90.
- 78. Steinbach, M.; Ertöz, L.; & Kumar, V. In *New directions in statistical physics: econophysics, bioinformatics, and pattern recognition*; Wille, L. T., Ed.; Springer-Verlag; Berlin, 2000; p 273.
- 79. John, G. H.; Kohavi, R.; & Pfleger, K. In *Eleventh International Conference on Machine Learning (ICML)* Cohen, W. W., Hirsh, H., Eds.; Morgan Kaufman; Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA, 1994; p 121.
- 80. Watanabe, S. *Knowing and guessing: A quantitative study of inference and information*; John Wiley & Sons Inc; New York, 1969.
- 81. Roth, H. J. There is no such thing as 'diversity'! Curr Opin Chem Biol 2005, 9, 293.
- 82. Böcker, A.; Schneider, G.; & Teckentrup, A. Status of HTS data mining approaches. *QSAR Comb Sci* **2004**, *23*, 207.
- 83. Selwood, D. L.; Livingstone, D. J.; Comley, J. C. W.; O'Dowd, A. B.; Hudson, A. T.; Jackson, P.; Jandu, K. S.; Rose, V. S.; & Stables, J. N. Structure-activity relationships of antifilarial antimycin analogues, a multivariate pattern recognition study. *J Med Chem* **1990**, *33*, 136.
- 84. Zheng, W.; & Tropsha, A. Novel variable selection quantitative structure-property relationship approach based on the k nearest neighbor principle. *J Chem Inf Comput Sci* **2000** 40, 185.
- 85. Dudek, A. Z.; Arodz, T.; & Gálvez, J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): A review. *Comb Chem High Throughput Screen* **2006**, *9*, 1.
- 86. Nath, R.; Rajagopalan, B.; & Ryker, R. Determining the saliency of input variables in neural networks classifiers. *Comput Ops Res* **1997**, *24*, 767.
- 87. Koivalishyn, V.; Tetko, V. I.; Luik, A. I.; Kholodovych, V. V.; Villa, A. E. P.; & Livingstone, D. J. Neural networks studies. Variable selection in the cascade-correlation learning architecture. *J Chem Inf Comput Sci* **1998**, *38*, 651.
- 88. Todeschini, R.; Galvagni, D.; Vilchez, J. L.; Del Olmo, M.; & Navas, N. Kohonen artificial neural networks as a tool for wawelength selection in multicomponent spectrofluorimetric PLS modeling: application to phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol mixtures. *Trends Anal Chem* **1999**, *18*, 93.
- 89. Burden, F. D.; Ford, M. G.; Whitley, D. C.; & Winkler, D. A. Use of automatic relevance determination in QSAR studies using Bayesian neural networks. *J Chem Inf Comput Sci* **2000**, *40*, 1423.
- 90. Agrafiotis, D. K.; & Cedeno, W. Feature selection for structureactivity correlation using binary particle swarms. *J Med Chem* **2002**, *45*, 1098.
- 91. Tetko, I. V.; Villa, A. E.; & Livingstone, D. J. Neural network studies. Variable selection. *J Chem Inf Comput Sci* **1996**, *36*, 794.
- 92. Glen, R. C.; & Adams, S. E. Similarity metrics and descriptor spaces Which combinations to choose? *QSAR Comb Sci* **2006**, *25*, 1133.
- 93. Guyon, I.; & Elisseeff, A. An introduction to variable and feature selection. *J Mach Lear Research* **2003**, *3*, 1157.
- 94. Hall, M.; Frank, E.; Holmes, G.; Pfahringer, B.; Reutemann, P.; & Witten, I. H. The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explor Newsl* **2009** *11*, 10.
- 95. Machine Learning Group. Weka. http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/ (visitado el 1 de octubre de 2013).
- 96. Tversky, A. Features of similarity. Psychol Rev 1977, 84, 327.
- 97. Chen, X.; & Brown, F. K. Asymmetry of chemical similarity. ChemMedChem 2007, 2, 180

- 98. Ágoston, V.; Kaján, L.; Carugo, O.; Hegedüs, Z.; Vlahovicek, K.; & Pongor, S. In *Essays in Bioinformatics*; Moss, D. S., Jelaska, S., Pongor, S., Eds.; IOS Press; The Netherland, 2005; p 11.
- 99. Ellis, D.; Furner-Hines, J.; & Willett, P. Measuring the degree of similarity between objects in text retrieval systems. *Perspect Inf Manag* **1994**, *3*, 128.
- 100. Cuadras, C. M. Distancias estadísticas. Estadística Española 1989, 30, 295.
- 101. Willett, P.; Barnard, J. M.; & Downs, G. M. Chemical similarity searching. *J Chem Inf Comput Sci* **1998**, *38*, 983.
- 102. Willett, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discov Today* **2006**, *11*, 1046.
- 103. David, H. W.; & William, G. M. No Free Lunch Theorems for Search, 1995.
- 104. Wolpert, D. H.; & Macready, W. G. No free lunch theorems for optimization. *IEEE T Evolut Comput* **2002**, *1*, 67.
- 105.Grünwald, P. In *Advances In Minimum Description Length: Theory And Applications*; Grünwald, P. D., Myung, I. J., Pitt, M. A., Eds.; MIT Press; Cambridge, Massachusetts, 2005; p 3.
- 106. Willett, P. Some heuristics for nearest-neighbor searching in chemical structure files. *J Chem Inf Comput Sci* **1983**, *23*, 22.
- 107. Friedman, J. H.; Bentlev, J. L.; & Finkel, R. A. An algorithm for finding best matches inlogarithmic expected time. *ACM Trans Marh Softw* **1977**, *3*, 209.
- 108.Bentley, J. L.; Weide, B. W.; & Yao, A. C. Optimal expected time algorithms for closest point problems. *ACM Trans Marh Softw* **1980**, *6*, 563.
- 109. Smeaton, A. F.; & Van Rijsbergen, C. J. The nearest neighbour in information retrieval. an algorithm using upperbounds. *ACM SIGIR Forum* **1981**, *16*, 83.
- 110. Murtagh, F. A very fast, exact nearest neighbour algorithm for use in information retrieval. *Inf Technol: Res Deu* **1982**, *1*, 275.
- 111. Van Marlen, G.; & Van Den Hende, J. H. Search strategy and data compression for a retrieval system with binary-coded mass spectra. *Anal Chim Acra* **1979**, *112*, 143.
- 112. Rasmussen, G. T.; Isenhour, T. L.; & Marshall, J. C. Mass spectral library searches using ion series data compression. *J Chem Inf Comput Sci* **1979**, *19*, 98.
- 113.Baldi, P.; Hirschberg, D. S.; & Nasr, R. J. Speeding up chemical database searches using a proximity filter based on the logical exclusive OR. *J Chem Inf Model* **2008**, *48*, 1367.
- 114.Cao, Y.; Jiang, T.; & Girke, T. Accelerated similarity searching and clustering of large compound sets by geometric embedding and locality sensitive hashing. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 953.
- 115. Kearsley, S. K.; Sallamack, S.; Fluder, E. M.; Andose, J. D.; Mosley, R. T.; & Sheridan, R. P. Chemical similarity using physiochemical property descriptors. *J Chem Inf Comput Sci* **1996**, *36*, 118.
- 116.Ginn, C. M. R.; Willett, P.; & Bradshaw, J. Combination of molecular similarity measures using data fusion. *Perspect Drug Discov Des* **2000**, *20*, 1.
- 117.Hert, J.; Willett, P.; Wilton, D. J.; Acklin, P.; Azzaoui, K.; Jacoby, E.; & Schuffenhauer, A. Comparison of fingerprint-based methods for virtual screening using multiple bioactive reference structures. *J Chem Inf Comput Sci* **2004**, *44*, 1177.
- 118.Nasr, R. J.; Swamidass, S. J.; & Baldi, P. F. Large scale study of multiple-molecule queries. *J Cheminf* **2009**, *1*, 1.
- 119.Chen, B.; Mueller, C.; & Willett, P. Combination rules for group fusion in similarity-based virtual screening. *Mol Inf* **2010**, *29*, 533
- 120.Geppert, H.; & Bajorath, J. Advances in 2D fingerprint similarity searching. *Expert Opin Drug Discov* **2010** *5*, 529.
- 121. Nicholls, A. What do we know and when do we know it? *J Comput-Aided Mol Des* **2008**, *22*, 239.
- 122. Witten, I. H.; & Frank, E. *Data Mining Practical Machine Learning Tools and Techniques*; 2nd ed.; Morgan Kaufmann; San Francisco, CA, 2005; 161-176.
- 123. Truchon, J.; & Bayly, C. I. Evaluating virtual screening methods: Good and bad metrics for the "early recognition" problem. *J Chem Inf Model* **2007**, *47*, 488.
- 124. Sheridan, R. P.; Singh, S. B.; Fluder, E. M.; & Kearsley, S. K. Protocols for bridging the peptide to nonpeptide gap in topological similarity searches. *J Chem Inf Model* **2001**, *41*, 1395.

- 125.Clark, R.; & Webster-Clark, D. Managing bias in ROC curves. *J Comput-Aided Mol Des* **2008**, *22*, 141.
- 126. Swamidass, S. J.; Azencott, C.-A.; Daily, K.; & Baldi, P. A CROC stronger than ROC: measuring, visualizing and optimizing early retrieval. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1348

REVISIÓN

Biodeterioro de monumentos y biorremediación: estado actual y perspectivas futuras

Gonzalo Gómez Alarcón^{1*}, Cesáreo Sáiz Jiménez²

¹Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. ²Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS-CSIC), Sevilla.

Recibido el 7 de noviembre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, № 4 (2013), pag. 562-579

RESUMEN

Durante siglos se ha intentado detener el proceso natural de destrucción de la piedra en construcciones y monumentos mediante obras de mantenimiento y reparación, usando técnicas y materiales tradicionales en siglos pasados como los morteros de cal y arena. A partir de la segunda mitad del siglo XX, se introducen los materiales poliméricos y sintéticos. En las últimas décadas, con el desarrollo de la biotecnología, las propuestas de restauración han cambiado drásticamente y se suponen superiores a los métodos tradicionales. Sin embargo, en algunos casos, los resultados no parecen convincentes. En la primera década del siglo XXI se está prestando una especial atención a la producción de calcita por bacterias en relación con un proceso de consolidación de la piedra deteriorada. La limpieza de frescos y pinturas con enzimas o mediante tratamiento con bacterias es otro de los temas que despierta una especial atención en la restauración y conservación de monumentos. La biotecnología tiene mucho que ofrecer pero debe superar las barreras que actualmente la convierten en una técnica prometedora en el campo de la conservación del patrimonio aunque, aún, de difícil aplicación a monumentos. Su utilización se efectúa en ensayos u objetos de dimensiones abarcables, mientras que su aplicación a escala industrial está aún por desarrollar.

Palabras clave: Deterioro; Biodeterioro; Consolidación; Calcita; Enzimas; Bacterias sulfato-reductoras; Biotecnología.

ABSTRACT

Monuments biodeterioration and bioremediación: current condition and future perspectives

For centuries the man has tried to stop the natural process of deterioration of the

^{*}e-mail: gongomeza@yahoo.es

building stones and monuments through maintenance and repairing works, using traditional techniques and materials such as mortar of lime and sand. From the second half of the 20th century, polymer and synthetic materials were introduced in conservation. In recent decades, with the application of biotechnology, the restoration proposals have changed dramatically and are supposed to be superior to traditional methods. However, in some cases, the results do not seem convincing. In the first decade of the 21st century a special attention is being paid to the production of calcite by bacteria as a process of consolidation of deteriorated stone. Cleaning of frescoes and paintings by enzymes or bacterial treatments are another issues that arouses a special attention in the restoration and conservation of monuments. Biotechnology has much to offer but must overcome the barriers that currently make it a promising technique in the field of cultural heritage conservation though, even, of difficult application to monuments. Currently, their use is restricted to test on object of manageable size, while its implementation on an industrial scale is yet to be developed.

Keywords: Deterioration; Biodeterioration; Consolidation; Calcite; Enzymes; Sulfate-reducing Bacteria; Biotechnology.

1. INTRODUCCIÓN

El hombre, desde tiempo inmemorial, ha utilizado la piedra como material de construcción o como soporte de sus obras de arte. Sin embargo, este material es efímero y los monumentos, esculturas y objetos de arte expuestos a la intemperie están sometidos, por acción de los agentes atmosféricos, a un proceso de deterioro. Este fenómeno ya era conocido en la antigüedad hasta el punto que Herodoto de Halicarnaso, en *Los Nueve Libros de la Historia*, se refería al deterioro de las pirámides, e indicaba que "el salitre revienta de tal modo sobre la superficie de la tierra, que hasta las pirámides va consumiendo". En la antigüedad las construcciones estaban sometidas a labores de restauración para paliar los efectos del deterioro, como se puede comprobar en el Coliseo de Roma, donde existe una lápida del siglo V con una inscripción en la que se agradece al prefecto de Roma su contribución económica para su restauración, necesaria tras un terremoto.

El proceso de alteración de una roca comienza tan pronto como se extrae de la cantera y entra en contacto con los agentes atmosféricos (viento, lluvia, heladas, etc.). Esta alteración inicialmente física y química, facilita la colonización por microorganismos y plantas produciendo un biodeterioro, fenómeno que implica el proceso de destrucción de un material de interés para el hombre por organismos vivos o por productos de su metabolismo. El biodeterioro tiene una connotación negativa (destrucción de construcciones, pinturas murales, libros, objetos de madera, etc.), en oposición a la biodegradación.

La biodegradación es una descomposición orgánica por microorganismos, en la que los materiales pueden transformarse en sustancias más simples, caso de contribuir al reciclaje de nutrientes o a la eliminación de contaminantes en la naturaleza (pesticidas, plásticos, etc.).

Biodegradación y biodeterioro son términos que se confunden fácilmente y son utilizados indistintamente, tanto en la literatura científica como en el lenguaje coloquial, y que se deben utilizar en su propio contexto.

Recientemente, se está prestando atención al concepto bio-receptividad (1), que se define como "la capacidad de un material para ser colonizado por uno o varios grupos de organismos vivos sin sufrir necesariamente un biodeterioro", o como "la totalidad de las propiedades de los materiales que contribuyen al establecimiento, colonización y desarrollo de fauna y flora. Según Guillitte (2) se pueden distinguir tres tipos de bio-receptividad: primaria, que corresponde al potencial intrínseco de un material para ser colonizado; secundaria, que es la habilidad de un material alterado por el efecto de los agentes atmosféricos para ser colonizado; y terciaria, que es la colonización de un material ya alterado por el hombre, como por ejemplo, después de un tratamiento de conservación. Recientemente se ha descrito un caso de bio-receptividad terciaria en la iglesia de San Roque, Campeche, México (3). Con todo, los casos más frecuentes son los de bio-receptividad secundaria, ya que la alteración de una roca expuesta a la intemperie cuyos elementos minerales han sido movilizados por los agentes atmosféricos, facilita la colonización de microorganismos y organismos fototróficos.

Prácticamente la totalidad de grupos de microorganismos, sean quimiosintéticos, heterótrofos o fotótrofos intervienen en el deterioro de la piedra y materiales de construcción (calizas, areniscas, morteros, adobe, ladrillos), mientras que otros grupos de organismos son selectivos en la alteración de determinados tipos de materiales (basidiomicetos especializados en la degradación de la madera, bacterias celulolíticas que deterioran el papel, etc.).

Los organismos implicados en los procesos de biodeterioro de monumentos abarcan desde las bacterias, arqueas, hongos, algas, líquenes y musgos hasta las plantas superiores (4). En muchos casos aparece una colonización inicial por organismos pioneros (bacterias, algas, líquenes) que abren el camino a otros, pudiéndose observar sucesiones de distintas comunidades. Así, tenemos como ejemplos la colonización bacteriana de pinturas rupestres (5), los ataques de hongos en pinturas murales modernas (6) o monumentos (7-9), la colonización de algas en ambientes subterráneos, favorecidas por la humedad y la iluminación artificial (10, 11), o a la intemperie (12) y la destrucción de mosaicos por líquenes, musgos y plantas superiores (13). En ciertos casos estos procesos de biodeterioro pueden controlarse o evitarse con un mantenimiento adecuado y la aplicación de

estrategias preventivas. Más drástica es la utilización de biocidas, no siempre recomendada (14, 15), y cuyo empleo está determinado por la propia naturaleza del monumento u obra de arte a conservar.

En los últimos años se han estudiado una serie de casos de biodeterioro en distintos monumentos que aportaron, junto al diagnóstico del proceso, medidas de conservación (3, 16, 17). Uno de los casos más frecuentes en cuevas visitables es la colonización de cianobacterias y algas, que suelen desarrollarse en el suelo, las estalactitas y estalagmitas, y en las paredes en aquellos lugares donde existen puntos de iluminación para la visita turística, como la cueva Tito Bustillo, en Ribadesella (18) o la cueva del Tesoro, en el Rincón de la Victoria (Figura 1). En posteriores visitas a estas cuevas se observó que la eliminación de algunos de estos focos condujo a la desaparición de la comunidad fotosintética. Sin embargo, el aporte de materia orgánica proporcionada por los polisacáridos extracelulares de las cianobacterias puede dar lugar a la proliferación de comunidades de bacterias y hongos, capaces de utilizarlos como fuente de carbono, si no se eliminan adecuadamente (19). Recientemente se ha efectuado un estudio sobre la eliminación de microorganismos fotosintéticos en cuevas catalanas combinando biocidas y modificando el sistema de iluminación (20).



Figura 1.- Crecimiento de cianobacterias y algas sobre las paredes de la Cueva del Tesoro, Rincón de la Victoria, Málaga, debido a la iluminación.

En España se han estudiado las comunidades microbianas de las pinturas

murales de la necrópolis de Carmona habiéndose encontrado una interesante asociación entre cianobacterias y arqueas (21), mientras que en la cueva de Altamira y Tito Bustillo se demostró la presencia de acidobacterias (5). Su función metabólica en esos ecosistemas es actualmente desconocida y su estudio constituye una línea actual de investigación.

Hace treinta años se estudió el deterioro de las pinturas murales del monasterio de La Rábida (Huelva), por la contaminación ambiental de un Polo Industrial (6). Se demostró que esta contaminación afectaba a las pinturas y que la deposición de los gases y aerosoles orgánicos e inorgánicos sobre los murales, así como la filtración de agua a través de los muros condujeron a su deterioro y posterior colonización por bacterias y hongos. En dichas pinturas la presencia del hongo *Cladosporium sphaerospermum* representó un importante factor de biodeterioro. La restauración de las pinturas, el control de los parámetros ambientales, entre ellos evitar la entrada de aire del exterior, la impermeabilización de los muros exteriores y la perforación de estos e introducción de una barrera de resina epoxídica para evitar el ascenso por capilaridad del agua del subsuelo, permiten hoy contemplar los murales en todo su esplendor.

Cuando se estudia la conservación de los monumentos, uno de los aspectos más dramáticos es comprobar, bien mediante observaciones a lo largo de los años o mediante documentación fotográfica, el acelerado proceso de biodeterioro y cómo las plantas son capaces de invadir y deteriorar pirámides mayas (22), mosaicos romanos excavados y expuestos a la intemperie (23), o invadir y fracturar estatuas, debido a la presión ejercida por sus raíces (Figura 2).

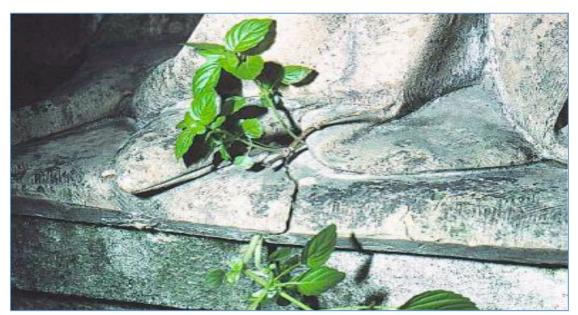


Figura 2.- Daños producidos por plantas en una estatua de terracota de la Puerta del Perdón, Catedral de Sevilla, en el año 1990.

En la ciudad romana de Itálica, España, tenemos ejemplos de mosaicos

exhumados en 1912, que tras su descubrimiento se encontraban en buen estado de conservación, y que en 75 años habían desaparecido completamente, debido a la ausencia de mantenimiento y protección (Figura 3). La acción destructiva de las plantas vasculares puede observarse en cualquier edificio histórico o monumento carente de mantenimiento y limpieza y es particularmente importante en climas tropicales. Su invasión representa la etapa final del proceso de biodeterioro y conduce a la larga a su ruina total. Este tipo de biodeterioro es común en todos los monumentos y países.



Figura 3.- Mosaico del Pasillo de la Casa de Neptuno, Itálica. Descubierto en 1912 (izquierda), y aspecto en 1987 (derecha).

2. CONTROL DEL DETERIORO

Durante siglos se ha intentado detener el proceso natural de destrucción de la piedra mediante obras de mantenimiento y reparación, usando técnicas y materiales tradicionales en siglos pasados como los morteros de cal y arena y, a partir de la segunda mitad del siglo XX, mediante materiales poliméricos y sintéticos. Mientras que este tipo de reparaciones encuentran buena acogida en los casos de deterioro por efecto de los agentes atmosféricos, en los casos de biodeterioro el problema es mucho más complicado, ya que requiere una previa, y agente biológico eliminación del que causa el Desgraciadamente ello no suele ser así en la mayoría de los casos, y los arquitectos y conservadores habitualmente no tienen en cuenta ni toman medidas adecuadas para controlar el biodeterioro. Algunos ejemplos dan buena prueba de ello, como en los casos de la ciudad romana de Baelo Claudia (24) o la iglesia de San Roque en Campeche, México (3).

Desde tiempo inmemorial se ha utilizado la lechada de cal para consolidar la superficie de la piedra debido a que el hidróxido cálcico se carbonata fácilmente en presencia del dióxido de carbono atmosférico originando la formación de calcita. La lechada conduce a la formación de una capa superficial de cristales de calcita, de espesor micrométrico, que se considera confiere una protección o consolidación insuficiente, ya que no penetra profundamente en la piedra deteriorada. Sin embargo, en las últimas décadas ha sido frecuente la utilización de polímeros sintéticos como consolidantes y protectores de la piedra y de pinturas murales, pero estos compuestos orgánicos se descomponen por su exposición a los agentes atmosféricos y también pueden ser utilizados por microorganismos como fuentes de carbono.

En el último tercio del siglo XX se incrementó el uso de polímeros sintéticos como consolidantes. Entre ellos destaca el frecuente empleo de la resina acrílica Paraloid B72. En 1996 Ariño y Saiz-Jimenez (24) detectaron que los capiteles de columnas de la ciudad romana de Baelo Claudia, consolidados con resina acrílica, mostraban un crecimiento endolítico de líquenes. En efecto, en la superficie de la capa de resina aplicada a los capiteles estucados aparecían estructuras liquénicas, que emergían al exterior destruyendo la resina. La observación al microscopio electrónico de barrido mostró claramente tales evidencias.

Por otra parte, Kigawa et al. (25) comprobaron que los hongos aislados del interior de túmulos japoneses del siglo VII y IX eran capaces de crecer sobre muestras de Paraloid B72, mientras que Capitelli et al. (26) mostraron que los mármoles de la catedral de Milán, tratados en 1972 con resinas acrílicas, presentaban un ennegrecimiento atribuible a la colonización por hongos dematiáceos, entre los que destacaban *Cladosporium* spp. y levaduras negras. El envejecimiento natural del polímero por exposición a los agentes atmosféricos puede facilitar su posterior colonización y utilización como fuente de carbono por los microorganismos (27).

En los últimos años, con el desarrollo de la biotecnología, las propuestas de restauración han cambiado drásticamente y se suponen superiores a los métodos tradiciones. Sin embargo, en algunos casos los resultados no parecen convencer a los especialistas en el tema. Así, a finales del siglo XX y en primera década del XXI, se ha prestado una especial atención a la producción de calcita por bacterias en relación con un supuesto proceso de consolidación de la piedra deteriorada. La precipitación de calcita era un proceso común en bacterias del suelo cultivadas en el laboratorio en un medio de acetato cálcico como fuente de carbono (28). Le Métayer-Levrel et al. (29) consideraron que este proceso de biomineralización de la calcita era de interés para la consolidación de los materiales pétreos. Estos autores utilizaron *Bacillus cereus* para el tratamiento de consolidación, mientras que De Muynck et al. (30) emplearon *Bacillus sphaericus* en la consolidación de

cinco calizas utilizadas en monumentos franceses y belgas. A tal fin, sumergieron durante 24 horas diferentes probetas en un medio de cultivo donde se inoculó previamente la bacteria y se incubó durante 24 horas. Después las probetas se secaron con papel de filtro y se sumergieron nuevamente, durante cuatro días, en un medio con urea y cloruro cálcico, que los autores denominaron medio de biodeposición. La profundidad de la biodeposición dependió de la porosidad de la piedra, y aquellas con macroporos presentaron una mayor deposición de calcita y resistencia al ensayo de congelación-descongelación y de resistencia a las sales. Obviamente este ensayo tiene difícil aplicación en el campo real.

Rodríguez-Navarro et al. (31) consideraron que los *Bacillus* no eran adecuados para este tipo de tratamiento debido a una serie de inconvenientes, entre los que destacaban una inefectiva consolidación debida a la deposición superficial de calcita, así como a la formación de biopelículas que taponaban los poros o de endosporas que pueden germinar de forma incontrolada en condiciones favorables. Estos autores propusieron como alternativa el empleo de *Myxococcus xanthus*, que produce cristales de calcita y vaterita en el sistema poroso de la piedra, haciéndola más resistente a los test mecánicos (sonicación) y más resistente a los ataques ácidos. La deposición de calcita ocurre en el laboratorio entre los primeros cinco y diez días. Por otra parte, esta bacteria no completa su ciclo biológico en cultivo y la falta de humedad en la piedra conduce a su muerte, lo que evita posteriores crecimientos indeseables. Sin embargo, estos y otros experimentos en el laboratorio tienen difícil extrapolación a la consolidación de paramentos monumentales por su gran extensión y parecen restringidos a pequeñas piezas más manejables (esculturas, objetos en piedra).

Recientemente, Daskalaki et al. (32) propusieron el uso de especies de *Pseudomonas, Pantoea* y *Cupriavidus* como candidatas para la bioconsolidación de materiales pétreos. El experimento resultó ambiguo, ya que utilizaban probetas de mármol directamente extraído de la cantera y es conocida la escasa porosidad de este material. Los autores reconocieron la deposición de calcita y vaterita biogénicas sobre la superficie del mármol utilizando una modificación del método de Boquet et al. (28), conocido por favorecer de forma prácticamente universal la formación de calcita por bacterias.

Otra de las recientes innovaciones biotecnológicas es el empleo de enzimas para la limpieza de pinturas murales y eliminación de pátinas de suciedad en la superficie de los monumentos. Se suelen emplear lipasas, proteasas, etc. Estas enzimas se han mostrado efectivas en la eliminación de materiales orgánicos habitualmente utilizados en la consolidación y restauración de pinturas (colas animales y caseína), pero tienen la desventaja de su deterioro con el tiempo debido al envejecimiento y pérdida de sus propiedades, junto a, en otros casos, la utilización por microorganismos de las proteínas como fuentes nutritivas. Ello da

lugar al deterioro de las pinturas y la necesidad de la eliminación de las proteínas por sus efectos bien nocivos o antiestéticos.

Beutel et al. (33) propusieron un método efectivo para eliminar de forma controlada las capas de caseína deteriorada de la superficie de pinturas murales. La caseína se utiliza para consolidar las pinturas, pero a lo largo del tiempo, esta se vuelve dura y termina por despegarse de la superficie pictórica. Así, en los frescos medievales de dos iglesias alemanas se encontraron capas de caseína aplicadas en los últimos 60 años para consolidar los pigmentos y evitar su caída. Estos frescos se encontraban en un alarmante estado de deterioro debido al envejecimiento de la proteína. Los autores aplicaron Alcalase 2.5 DX L, conocida por su efecto proteolítico, inmovilizada en una membrana de celulosa y observaron una digestión proteolítica controlada, procediendo a la eliminación de los restos de caseína mediante lavado a través de una membrana de celulosa, en un proceso de 30 minutos de duración. Los métodos habituales de eliminación de la caseína incluyen la remoción mecánica y utilización de solventes orgánicos y el método propuesto por Beutel et al. (33) competía ventajosamente y parecía más controlable.

Ranalli et al. (34) combinaron el empleo de bacterias y enzimas en la restauración de un fresco muy deteriorado en Pisa, a fin de eliminar la cola animal usada en su consolidación. El procedimiento consistió en la aplicación de *Pseudomonas stutzeri*, siendo el método más efectivo la utilización de una capa de algodón empapada con una suspensión de bacterias sobre la superficie del fresco, durante un periodo de 8-12 horas frente a otras aplicación mediante spray o pincel. Sin embargo, la completa eliminación de la cola dependió del grosor de la capa y, en los casos en que esta no resultó totalmente efectiva, se llevó a cabo una etapa final que implicaba la aplicación de enzimas: proteasa y colagenasa, con lo que se consiguió la completa eliminación de la cola. El coste del proceso, comparado con los métodos tradicionales, resultó mucho menor.

Valentini et al. (12) presentaron un nuevo procedimiento de limpieza biológica para eliminar la pátina biológica de la piedra, consistente en el uso de glucosa oxidasa capaz de producir in situ peróxido de hidrógeno (agente de limpieza con propiedades oxidantes). El éxito dependió de la porosidad de la piedra y de la profundidad de la pátina. La validación del método, que resultó ventajoso, se efectuó frente a procedimientos tradicionales (solución tampón de NH₄)₂CO₃ y EDTA y tratamientos con lipasa.

Uno de los principales efectos de la contaminación atmosférica en ambientes urbanos es el ennegrecimiento de las fachadas de edificios y monumentos. Ello se debe a la formación de costras negras sulfatadas originadas por el dióxido de azufre, hidrocarburos y materia particulada (hollín) emitidos por los tubos de escape de los vehículos. En esas condiciones se forma ácido sulfúrico

que ataca la caliza formando yeso (sulfato cálcico dihidratado), que suele cristalizar englobando el hollín y toda la materia depositada sobre la superficie de los monumentos (35).

Las costras negras se pueden eliminar mediante limpieza mecánica (Figura 4) o utilizando bacterias. Los pioneros en este tipo de tratamientos fueron Atlas et al. (36) y Gauri et al. (37) quienes aplicaron *Desulfovibrio desulfuricans* a piezas de mármol y a una estatua recubierta de costras negras sulfatadas a fin de eliminar la pátina de deterioro. La estatua se sumergió en el medio de cultivo y, después de 24 horas, las costras negras se eliminaron casi completamente. Esta metodología presenta obviamente dificultades en su aplicación más extensiva a fachadas de monumentos.



Figura 4.- Fachada del Rectorado de la Universidad de Sevilla durante su primera limpieza mecánica hace unos 25 años. Con posterioridad se han efectuado nuevas limpiezas en los últimos años.

Tras estas investigaciones iniciales, Ranalli et al. (38) emplearon *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio vulgaris* para la limpieza de mármol con costras negras sulfatadas. En vez de sumergir los objetos en el medio de cultivo,

estos autores utilizaron sepiolita como vector de las bacterias, ya que las bacterias colonizaron la sepiolita y permitieron un mejor contacto con la superficie a tratar. Tras 36 horas de tratamiento se eliminó un 80% del sulfato inicial. El inconveniente de este método fue el tiempo requerido para la colonización efectiva de la sepiolita (de diez a catorce días) y que el sulfuro de hidrógeno producido reaccionaba con el hierro del medio de cultivo formando precipitados de sulfuro de hierro. Posteriormente, Capitelli et al. (39) utilizaron *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* para la limpieza de costras negras, demostrando que se eliminaba un 98% de sulfato en 45 horas de tratamiento y evitando la precipitación de sulfuro de hierro al utilizar un medio de cultivo sin este elemento. Capitelli et al. (40) compararon la efectividad de una limpieza química con EDTA frente a la biológica en un altorelieve de la catedral de Milán. Estos autores comprobaron que la limpieza con *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* fue más efectiva que la realizada con EDTA.

Gioventù et al. (41) investigaron la eficiencia de diferentes tratamientos para la eliminación de costras negras sulfatadas. Junto al tratamiento biológico con *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* ensayaron la limpieza con láser y la química con carbonato amónico en diferentes tipos de materiales de la catedral de Florencia: mármol, serpentina y marga. Los resultados obtenidos demostraron que la limpieza con láser no fue particularmente eficiente, ya que no eliminó completamente las costras. El tratamiento químico dejaba también algunas costras sin eliminar, incluso después de varias aplicaciones y resultó ser el menos controlable de los métodos empleados. El método biológico además de ser el más efectivo tenía la ventaja adicional de que el calcio liberado en la disolución del yeso reaccionaba con dióxido de carbono producido por la bacteria formando calcita, por lo que tenía al mismo tiempo un efecto consolidante.

Más recientemente, Troiano et al. (42) combinaron eficientemente la bacteria sulfato-reductora utilizada habitualmente en anteriores trabajos (38-41) con un pretratamiento con un detergente no-iónico (Tween 20) para eliminar las costras negras sulfatadas de una estatua del Cementerio Monumental de Milán. Los dos tratamientos conjuntos produjeron una reducción del 70% en el tiempo total necesario para la limpieza con respecto al tratamiento biológico individual (Figura 5). Por último, también se ensayó la limpieza biotecnológica en dos estatuas del Castillo del Buen Consejo en Trento, Italia, seguida de un posterior tratamiento con el biocida Biotin N con óptimos resultados. El objetivo fue eliminar las costras negras sulfatadas así como la colonización biológica existente (bacterias, cianobacterias, algas y hongos) que teñían las estatuas con diversos colores verde, verde oscuro y negro (43).



Figura 5.- Monumento funerario realizado por Lina Arpesani en 1921 en memoria de 'Neera', la poetisa Anna Zuccari, antes (izquierda) y después (derecha) de la limpieza biológica. Fotos cortesía de la Dra. Francesca Cappitelli, Universidad de los Estudios de Milán, y de la empresa Micro4You que proporcionó las bacterias usadas en la limpieza de la estatua.

No solo el sulfato, sino también el nitrato, se puede eliminar mediante tratamiento biológico. Alfano et al. (44) ensayaron conjuntamente, y por separado, un tratamiento con *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Desulfovibrio vulgaris* para la eliminación de sulfatos y nitratos. En 24 horas este procedimiento eliminó el 55% del nitrato y el 85% de los depósitos de sulfato. Bosch Roig et al. (45) demostraron que una aplicación de 90 minutos de *Pseudomonas stutzeri* sobre agar proporcionaba una limpieza efectiva de eflorescencias insolubles de nitratos depositadas sobre la superficie de una pintura mural en Valencia, con una reducción del 92% del nitrato.

Por otra parte, no solo las bacterias sulfato-reductoras resultan efectivas en la eliminación de costras negras sulfatadas. Las costras representan también una fuente de azufre para las cianobacterias, que lo utilizan para la síntesis de proteínas y de la vaina. La carencia de azufre en un medio de cultivo produce cambios ultraestructurales notables en las cianobacterias (46, 47). Igualmente, especies de *Bacillus y Pseudomonas* utilizaron como fuente de carbono los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en las costras negras sulfatadas (48), lo que contribuye a una detoxificación de la carga contaminante presente en las costras negras (49).

3. CONSIDERACIONES FINALES

La identificación de la microflora colonizadora, así como la evaluación de los daños del biodeterioro son de gran importancia ya que permiten la determinación del tipo de colonización, bio-receptividad y el diseño de intervenciones efectivas para reducir el daño y obtener una prevención a largo plazo del monumento deteriorado. Por lo tanto, para el control y la erradicación de microorganismos de las superficies de monumentos se suelen utilizar frecuentemente biocidas en un protocolo de restauración (50). Sin embargo, la aplicación de biocidas no es siempre una norma de intervención y suelen darse casos en los que su no utilización origina nuevos daños en el monumento restaurado (3).

Los biocidas son compuestos químicamente activos que pueden influir negativamente en la salud humana y en el ambiente. Cuando se utilizan biocidas los requisitos necesarios son una baja toxicidad y una elevada eficacia contra la amplia gama de microorganismos que colonizan los monumentos y objetos artísticos. Actualmente se está recomendando, como una alternativa a los biocidas convencionales, el uso de tratamientos fotocatalíticos, tales como nanocompuestos de TiO₂-SiO₂, para prevenir el biodeterioro y, a largo plazo, obtener una limpieza automática para el material de construcción. Sin embargo, estos productos deben cumplir una lista específica de requisitos químicos, físicos y estéticos. Por lo tanto, actualmente se están llevando a cabo ensayos aplicando tratamientos fotocatalíticos en rocas monumentales, con el fin de diseñar el tratamiento más efectivo para la eliminación de las comunidades microbianas activas y evaluar sus propiedades de limpieza (51, 52). Este procedimiento puede proporcionar estrategias eficaces para minimizar el biodeterioro y para el desarrollo de nuevos tratamientos sostenibles basados en la nanotecnología.

En el campo de la conservación del patrimonio, unos autores abogan por una conservación preventiva, mejor que actuar directamente sobre el monumento u objeto artístico en cuestión o aplicar biocidas. De esta forma, un control de las condiciones ambientales en las que se encuentra el bien a conservar se considera mucho más efectivo que un tratamiento, que puede comportar una agresión y posterior deterioro. Así, en los archivos y bibliotecas, donde en los casos de elevada humedad proliferan los hongos que atacan el papel y pergaminos, el mantener una temperatura por debajo de 18° C y una humedad relativa no superior al 65% impide el crecimiento de microorganismos. Claramente este control solo puede realizarse en archivos y museos o en frescos y pinturas en el interior de edificios, pero no en monumentos expuestos a la intemperie.

Otra medida es el adecuado mantenimiento, que ayuda claramente a evitar problemas, sobre todo la limpieza periódica de polvo y suciedad que se depositan sobre los objetos. A este respecto, un estudio efectuado en el Retablo Mayor de la catedral de Sevilla demostró que la acumulación de polvo y humedad conducían a

una alteración de las maderas y policromía (Figura 6). La composición del polvo fue muy heterogénea, incluyendo partículas minerales resultantes del deterioro de los materiales de construcción de las bóvedas, fragmentos de elementos decorativos (policromía y dorado), productos de la contaminación atmosférica, así como fragmentos de insectos y arácnidos, excrementos de aves, además de un significativo y elevado número de bacterias y esporas de hongos, que han sido eliminados en la reciente restauración del retablo.



Figura 6.- Ensayo de limpieza efectuado en el Retablo Mayor de la Catedral de Sevilla en el año 2012.

Por otra parte, en las dos últimas décadas se han publicado una serie de investigaciones proponiendo la utilización de bacterias y enzimas para limpieza y consolidación de bienes culturales. Mientras que los ensayos presentados, a escala reducida, tanto en el laboratorio como in situ, parecen ser prometedores, la aplicación real puede ser compleja por las grandes superficies a tratar, el volumen de líquido a utilizar, el periodo de aplicación necesario, etc. y, de hecho, la eliminación de costras negras sulfatadas en monumentos, a escala industrial, suele seguir efectuándose mediante limpieza mecánica o con limpieza láser en pequeños objetos o estatuas.

La transferencia del laboratorio al campo cuenta con grandes inconvenientes, particularmente en los casos de consolidación con calcita procedente de bacterias. En estos casos es dudosa la capacidad de penetración en el sistema poroso y que la calcita cristalice y consolide en el interior de la piedra. Se considera que en la mayoría de los casos se produce una bioprecipitación

superficial o en poros cercanos a la superficie. Los trabajos publicados no suelen presentar datos sobre la aplicación de ensayos normalizados de análisis de resistencia de materiales en probetas consolidadas por bioprecipitación y solo en algunos casos se indica que las probetas son más resistentes a la sonicación o que la calcita de origen biogénico es más insoluble que la calcita producida inorgánicamente, argumentándose que se debe a la incorporación de moléculas orgánicas producidas durante el metabolismo de las bacterias (53).

La biotecnología tiene mucho que ofrecer pero debe superar las barreras que actualmente la convierten en una técnica prometedora en el campo de la conservación del patrimonio aunque resulta de difícil aplicación a casos reales con grandes extensiones de fachadas. Su empleo se efectúa en ensayos u objetos de dimensiones abarcables, mientras que su aplicación a escala industrial está aún por desarrollar.

5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el proyecto Consolider, TCP CSD2007-00058. Se agradece al Cabildo Catedral de Sevilla y a la empresa Ágora las facilidades para el estudio del Retablo Mayor.

6. REFERENCIAS

- 1. Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M.F., Prieto, B. (2012) Bioreceptivity of building stones: a review. *Sci. Total Environ.* 426: 1-12.
- 2. Guillitte, O. (1995) Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sci. Total Environ.* 167: 215-220.
- 3. Jurado V., Miller, A.Z., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Benavente, D., Rogerio-Candelera, M.A., Reyes, J., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2013) Recolonization of mortars by endolithic organisms: a case of tertiary bioreceptivity on the walls of San Roque Church in Campeche (Mexico). *Constr. Build. Mater.* (en prensa).
- 4. Saiz-Jimenez, C. (2001) The biodeterioration of building materials. En: J. Stoecker II (ed.), A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion, vol. 2. NACE, Houston, pp. 41-420
- 5. Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rolleke, S. (2002) Altamira cave paleolithic paintings harbour partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 7-11.
- 6. Sáiz-Jiménez, C. (1982) Causas del deterioro de los murales de Daniel Vázquez Díaz, Monasterio de Santa María de la Rábida, Huelva. *Mundo Científ.* 18: 1007-1011.
- 7. De la Torre, M.A., Gomez-Alarcon, G., Melgarejo, P., Saiz-Jimenez, C. 1991. Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Sci. Total Environ*. 107: 159-168.
- 8. De la Torre, M.A., Gomez-Alarcon, G., Vizcaíno, C., García, M.T. (1993) Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry* 19: 129-147.
- 9. Gómez-Alarcón, G., Muñoz, M., Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Saiz-Jimenez C. (1995) Microbial activity in weathered sandstones: the case of Carrascosa del Campo chuch. *Sci. Total Environ.* 167: 249-254.
- 10. Ariño, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C. (1997) Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* 36: 366-373.
- 11. Saiz-Jimenez, C. (2012) Microbiological and environmental issues in show caves. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 2453-2464.

- 12. Valentini, F., Diamanti, A., Palleschi, G. (2010) <u>New bio-cleaning strategies on porous</u> building materials affected by biodeterioration event. *Appl. Surf. Sci.* 256: 6550-6563.
- 13. Saiz-Jimenez, C. (1994) Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. En: G.C. Llewellyn, W.W. Dashek, C.E. O'Rear (eds.), *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*, Plenum, New York, pp. 587-603.
- 14. Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2010) The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology* 156: 644-652.
- 15. Martin-Sanchez, P.M., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2012) Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: The case of the Lascaux Cave in France. *Environ. Sci. Technol.* 46: 3762-3770.
- 16. Saiz-Jimenez, C., Cuezva, S., Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Benavente, D., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. (2011). Paleolithic art in peril: Policy and science collide at Altamira Cave. *Science* 334: 42-43.
- 17. Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. *Écologie Microbienne de la Grotte de Lascaux.* Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. ISBN: 978-84-694-7852-3.
- 18. Saiz-Jimenez, C. (1999) Biogeochemistry of weathering processes in monuments. *Geomicrobiol. J.* 16: 27-37.
- 19. Saiz-Jimenez, C. (2010) Painted Materials. In: R. Mitchell, C.J. McNamara, (eds.), *Cultural Heritage Microbiology*. ASM Press, Washington, DC pp. 3-13.
- 20. Akatova, E., Roldan, M., Hernandez-Mariné, M., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2009) On the efficiency of biocides and cleaning treatments in restoration works of subterranean environments. En: *Science and Cultural Heritage in the Mediterranean Area*. Regione Siciliana, Palermo, pp. 317-322.
- 21. Piñar, G., Saiz-Jimenez, C., Shabereiter-Gurtner, C., Blanco-Varela, M.T., Lubitz, W., Rölleke, S. (2001) Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 45-54.
- 22. Garcia de Miguel, J.M., Sanchez-Castillo, L. Ortega-Calvo, J.J., Gil, J.A., Saiz-Jimenez, C. (1995) Deterioration of building materials from the Great Jaguar Pyramid at Tikal, Guatemala. *Build. Environ.* 30: 591-598.
- 23. Saiz-Jimenez, C. (1990) The mosaics of Italica. Eur. Cult. Herit. Newsl. Res. 4: 34-38.
- 24. Ariño, X., Saiz-Jimenez, C. (1996) Lichen deterioration of consolidants used in the conservation of stone monuments. *The Lichenologist* 28: 391-394.
- 25. Kigawa, R., Hayakawa, N., Yamamoto, N., Kawanobe, W., Sano, C., Aoki, S. **(**2005) Evaluation of mould resistance of various synthetic resins used in conservation of historic sites. *Hozon Kagaku* 44: 149-156.
- 26. Cappitelli, F., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Toniolo, L., Brusetti, L., Florio, S., Principi, P., Borin, S., Sorlini, C. (2007) Synthetic consolidants attacked by melanin-producing fungi: Case study of the biodeterioration of Milan (Italy) cathedral marble treated with acrylics. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 271-277.
- 27. Cappitelli, F., Sorlini, C. (2008) Microorganisms attack synthetic polymers in items representing our cultural heritage. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 564-569.
- 28. Boquet, E., Boronat, A., Ramos-Cormenzana, A. (1973) <u>Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon</u>. *Nature* 246: 527-529.
- 29. Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubière, J.F., Perthuisot, J.P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sediment. Geol.* 126: 25-34.
- 30. De Muynk, W., Leuridan, S., Van Loo, D., Verbeken, K., Cnudde, V., De Belie, N., Verstraete, W. (2011) Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6808-6820.
- 31. Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K.B., Gonzalez-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2182-2193.
- 32. Daskalakis, M.I., Magoulas, A., Kotoulas, G., Catsikis, I., Bakolas, A., Karageorgis, A.P., Mavridou, A., Doulia, D., Rigas, F. (2013) *Pseudomonas, Pantoea* and *Cupriavidus* induce calcium carbonate precipitation for biorestoration of ornamental stone. *J. Appl. Microbiol.* 115: 409-423.

- 33. Beutel, S., Klein, K., Knobbe, G., Königfeld, P., Petersen, K., Ulber, R., Scheper, T. (2002) Controlled enzymatic removal of damaging casein layers on medieval wall paintings. *Biotechnol Bioeng.* 80: 13-21.
- 34. Ranalli, G., Alfano, G., Belli, C., Lustrato, G., Colombini, M.P., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P., Cappitelli, F., Sorlini, C. (2005) Biotechnology applied to cultural heritage: biorestoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 98: 73-83.
- 35. Saiz-Jimenez, C. (2003) Organic pollutants in the built environment and their effect on the microoorganisms. En: P. Brimblecombe (ed.) *The Effects of Air Pollution on the Built Environment*. Air Pollution Reviews vol. 2, Imperial College Press, London, pp. 183-225.
- 36. Atlas, R.M., Chowdhury, A.N., Gauri, K.L. (1988) Microbial calcification of gypsum-rock and sulfated marble. *Stud. Conserv.* 33: 149-153.
- 37. Gauri, L.K., Parks, L., Jaynes, J., Atlas, R. (1992) Removal of sulphated crust from marble using sulphate-reducing bacteria. En: R.G.M. Webster (ed.), *Stone Cleaning and the Nature, Soiling and Decay Mechanisms of Stone.* Donhead, London, pp. 160-165.
- 38. Ranalli, G., Chiavarini, M., Guidetti, V., Marsala, F., Matteini, M., Zanardini, E., Sorlini, C. (1997) The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks. *Int. Biodeter. Biodegr.* 40: 255-261.
- 39. Cappitelli, F., Zanardini, E., Ranalli, G., Mello, E., Daffonchio, D., Sorlini, C. (2006) Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3733–3737.
- 40. Cappitelli, F., Toniolo, L., Sansonetti, A., Gulotta, D., Ranalli, G., Zanardini, E., Sorlini, C. (2007) Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 671-5675.
- 41. Gioventù, E., Lorenzi, P.F., Villa, F., Sorlini, C., Rizzi, M., Cagnini, A., Griffo, A., Cappitelli, F. (2011) Comparing the bioremoval of black crusts on colored artistic lithotypes of the Cathedral of Florence with chemical and laser treatment. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65: 832-839.
- 42. Troiano, F., Gulotta, D., Balloi, A., Polo, A., Toniolo, L., Lombardi, E., Daffonchio, D. Sorlini, C., Cappitelli, F. (2013) Successful combination of chemical and biological treatments for the cleaning of stone artworks. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85: 294-304.
- 43. Polo A., Cappitelli F., Brusetti L., Principi P., Villa F., Giacomucci L., Ranalli G., Sorlini C. (2010) Feasibility of removing surface deposits on stone using biological and chemical remediation methods. *Microb. Ecol.* 60: 1-14.
- 44. Alfano, G., Lustrato, G., Belli, C., Zanardini, E., Cappitelli, F., Mello, E., Sorlini, C., Ranalli, G. (2011) The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: The case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65: 1004-1011.
- 45. Bosch Roig, P., Regidor Ros, J.L., Montes Estellés, R. (2013) Biocleaning of nitrate alterations on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 84: 266-274.
- 46. Ortega-Calvo, J.J., Ariño, X., Stal, L., Saiz-Jimenez, C. 1994. Cyanobacterial sulfate accumulation from a historic building black crust. *Geomicrobiol. J.* 12: 15-22.
- 47. Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C. (1995) Effect of sulphur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeothece* sp. PCC 6909. *Arch. Microbiol.* 16: 447-453.
- 48. Ortega-Calvo, J.J., Saiz-Jimenez, C. (1997) Microbial degradation of phenanthrene in two European cathedrals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 95-101.
- 49. Saiz-Jimenez, C. (1997) Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on to historic buildings. *Int. Biodeter. Biodegr.* 40. 225-232.
- 50. Blazquez, A.B., Lorenzo, J., Flores, M., Gómez-Alarcón, G. (2000) Evaluation of the effect of some biocides against organisms isolated from historic monuments. *Aerobiologia* 16: 423-428.
- 51. Pinho, L., Mosquera, M.J. (2011) Titania-silica nanocomposite photocatalysts with application in stone self-cleaning. *J. Phys. Chem. C* 115: 22851-22862.
- 52. Pinho, L., Mosquera, M.J. (2013) Photocatalytic activity of TiO₂–SiO₂ nanocomposites applied to buildings: Influence of particle size and loading. *Appl. Catal. B-Environ.* 134-135: 205-221.

53.	Webster, A., May, E. (2006) Bioremediation of weathered-building stone surfaces. <i>Biotechnol.</i> 24: 255-260.	Trends

REVISIÓN

Péptidos, lagartos y diseño de fármacos. Agentes antidiabéticos relacionados con las incretinas

José Carlos Menéndez^{1,2}*, Mercedes Villacampa¹

¹Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040, Madrid. ²Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Recibido el 22 de noviembre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol. 79, Nº 4 (2013), pag. 580-612

RESUMEN

La diabetes de tipo 2 se ha descrito como una epidemia de ámbito mundial y constituye uno de los mayores desafíos terapéuticos actuales. Las incretinas, en especial GLP-1, son hormonas peptídicas intestinales que estimulan la secreción de insulina y presentan otras acciones beneficiosas, incluyendo una disminución de masa corporal, pero plantean los problemas habituales de los fármacos peptídicos: reducida biodisponibilidad oral y duración de acción muy breve. Se describen en esta revisión los avances recientes en el diseño de antidiabéticos basados en las incretinas, que permiten la superación de dichas limitaciones, así como de inhibidores de su degradación hidrolítica.

Palabras clave: Diabetes; Incretinas; Dipeptidil peptidasa IV.

ABSTRACT

Peptides, lizards and drug design. Incretin-related antidiabetic agents

Type II diabetes has been described as a world epidemy and constitutes one of the major therapeutic challenges nowadays. Incretins, and GLP-1 in particular, are intestinal peptide hormones that stimulate insulin secretion and show other beneficial actions, including weight loss, but they suffer from the limitations common to most peptide drugs, namely poor oral bioavailability and a very short duration of action. In the present review, we describe recent advances in the design of incretin-based antidiabetic drugs that overcome these limitations, as well as recent work on inhibitors of their hydrolytic degradation.

Keywords: Diabetes; Incretins; Dipeptidyl peptidase IV.

^{*}e-mail: josecm@farm.ucm.es

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes, en especial la de tipo 2, es una enfermedad crónica y progresiva que se caracteriza por la resistencia de los tejidos periféricos a los efectos metabólicos de la insulina.

Requiere tratamiento de por vida y se ha descrito como una epidemia de ámbito mundial que actualmente afecta a unos 250 millones de personas. El coste humano, económico y social asociado a sus complicaciones hace que esta enfermedad sea una de las que plantea consecuencias más serias en términos de salud pública. Pese a ello, hasta hace unos años no se disponía de alternativas terapéuticas a los fármacos tradicionales.

Las terapias convencionales de la diabetes de tipo 2 se han centrado en elevar los niveles plasmáticos de insulina, bien por administración directa de esta o mediante el empleo de fármacos capaces de incrementar su secreción (antidiabéticos orales), incrementar la sensibilidad a la insulina de determinados tejidos o reducir la absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal.

Estos fármacos tradicionales no son óptimos y dejan sin tratar muchos aspectos importantes de la diabetes, tales como la reducción de la sensibilidad de las células b a la glucosa, la disminución en el número o funcionalidad de las células b o el incremento de la producción de glucosa por la vía de la gluconeogénesis a causa de un incremento en la secreción de glucagón.

Además, los tratamientos convencionales suponen un serio riesgo de inducir episodios de hipoglucemia. P

or todos estos motivos, el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos se puede considerar de una importancia crucial (1, 2). Para poner el presente artículo en su contexto, resumimos en la Tabla 1 las principales aproximaciones actuales al tratamiento de la diabetes de tipo 2 (3).

De ellas, vamos a centrar nuestra atención en los fármacos relacionados con las incretinas, principalmente en los agonistas del receptor de GLP-1 y en los inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (4).

Tabla 1.- Terapias actuales de la diabetes de tipo 2.

Grupo de fármacos	Diana molecular	Sitio de acción principal		
1. Secretagogos de insulina				
Sulfonilureas	Receptor de sulfonilureas	Páncreas		
	(SUR)			
Meglitinidas	Canal K-ATP	Páncreas		
Análogos y miméticos de GLP-1	Receptor GLP-1	Páncreas		
Inhibidores de DPP-IV	Dipeptidil peptidasa IV	Intestino, páncreas		
(gliptinas)	(DPP-IV)			
2. Sensibilizadores a insulina				
Metformina	Desconocida	Hígado, intestino, páncreas		
Tiazolidinonas (glitazonas)	PPARγ	Intestino, páncreas		
3. Otros				
Insulina	Receptor de insulina	Hígado, músculos		
Inhibidores de α-glicosidasas	α-Glicosidasas	Páncreas, intestino delgado		
Inhibidores de SGLT2	Cotransportador 2 de	Riñón		
	sodio-glucosa (SGLT2)			

Se sabe desde 1964 que la administración oral de glucosa produce una respuesta insulínica superior a una dosis idéntica administrada por vía intravenosa, lo cual sugería la existencia de factores digestivos capaces de estimular la secreción de insulina. La identificación posterior de estos factores con las incretinas, un grupo de hormonas peptídicas segregadas en el intestino como respuesta a la ingesta de alimentos, condujo a denominar "efecto incretina" a la diferente respuesta a la glucosa oral y parenteral (5). Entre estas hormonas, es de especial interés el péptido GLP-1 (glucagon-like peptide 1), que es producido por las células intestinales L. Su biosíntesis se lleva a cabo a partir de una proteína de 160 aminoácidos llamada proglucagón, que recibe este nombre porque su degradación hidrolítica en las células \alpha pancreáticas genera la hormona hiperglucemiante glucagón. En cambio, su hidrólisis en las células intestinales α conduce, entre otros péptidos, a un fragmento de 37 aminoácidos conocido como GLP-1-(1-37). La posterior escisión de una cadena correspondiente a los seis primeros aminoácidos de este péptido conduce a una de las hormonas activas, llamada GLP-1-(7-37), pero más del 80% de la bioactividad corresponde a otra hormona, conocida como GLP-1-(7–36)NH₂, en la que falta la glicina 37 y el nuevo residuo C-terminal, una arginina, está en forma de amida (6).

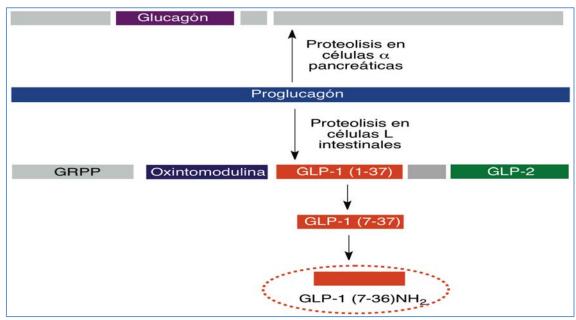


Figura 1.- Esquema de la biosíntesis de la hormona GLP-1 y de otros péptidos relacionados a partir de proglucagón (en gris, fragmentos peptídicos inactivos o de actividad poco conocida).

Estas hormonas disminuyen la glucemia a través de varios mecanismos, principalmente un estímulo de la secreción de insulina por el páncreas y una inhibición de la secreción del glucagón, otra hormona peptídica capaz de elevar los niveles de glucosa en plasma (Figura 2).

Además, produce otros efectos beneficiosos para los pacientes diabéticos por conducir a una pérdida de peso, que se debe a un aumento de la sensación de saciedad por retraso en el vaciamiento gástrico y a la disminución del apetito por un mecanismo central. También son beneficiosos otros efectos, que incluyen una disminución en la producción de glucosa por el hígado, un incremento en la captación y almacenamiento de glucosa por los músculos y los adipocitos y propiedades cardio y neuroprotectoras (8, 9).

Desde el punto de vista de su posible empleo en el tratamiento de la diabetes, la activación de los receptores de GLP-1 presenta algunas ventajas adicionales sobre los agentes de uso habitual, ya que corrige la hiperglucemia en ayunas pero no induce hipoglucemia, uno de los principales problemas asociados a la medicación antidiabética tradicional. Por otra parte, la proliferación de células β pancreáticas contribuye al efecto antidiabético, al mejorar la funcionalidad del páncreas, pero conduce también a un incremento del riesgo de que se desarrollen casos de pancreatitis como efecto no deseado. Por la misma razón, se ha planteado la necesidad de considerar la posibilidad de que tratamientos prolongados incrementen el riesgo de cáncer de páncreas (10).

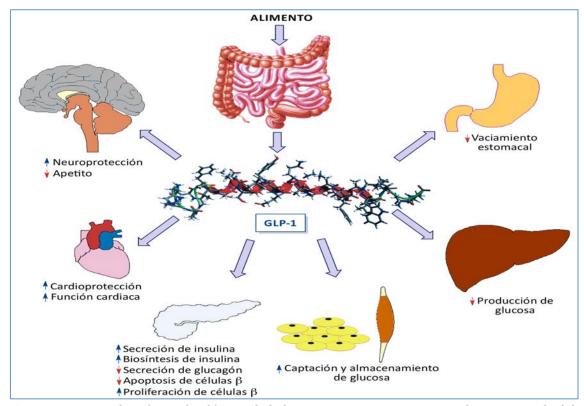


Figura 2.- Principales efectos fisiológicos de la hormona GLP-1. La estructura de esta procede del Protein Data Bank (1D0R, D0I:10.2210/pdb1d0r/pdb). Esta y todas las proteínas que aparecen en figuras posteriores han sido descargadas del RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) y visualizadas con la versión para Mac OSX de Avogadro 1.01 (7), salvo que se indique otra cosa.

Existen dos estrategias principales para el diseño de fármacos antidiabéticos basados en el aprovechamiento de la acción hipoglucemiante de las incretinas (Figura 3). Por un lado, se están desarrollando agonistas del receptor de GLP-1, que en la actualidad son péptidos análogos de la hormona natural.

El principal factor que condiciona su diseño es la extremadamente breve semivida plasmática de GLP-1 (2 minutos, aproximadamente), que hace inviable su empleo como fármaco. Esta fugaz duración de acción se debe a dos factores:

- (a) Una rápida eliminación renal, debida a su peso molecular relativamente bajo.
- (b) Su metabolismo por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), que ataca el extremo N-terminal de la hormona e hidroliza el fragmento formado por los dos últimos aminoácidos. Resulta así el péptido GLP-1-(9–36)NH₂, que es el que se encuentra en mayor concentración en plasma y que tiene una afinidad 100 veces menor por el receptor GLP-1r que la hormona completa.

Para superar estos problemas, se han sintetizado numerosos análogos peptídicos de GLP-1 con modificaciones destinadas a superar estas limitaciones, muchos de los cuales están inspirados en la estructura de la exendina 4, un péptido natural que muestra resistencia a DPP-IV (11-14)

En una estrategia alternativa, se han desarrollado también moléculas pequeñas que actúan como inhibidores de DPP-IV (15-17) y por tanto incrementan los niveles de la hormona GLP-1 endógena.

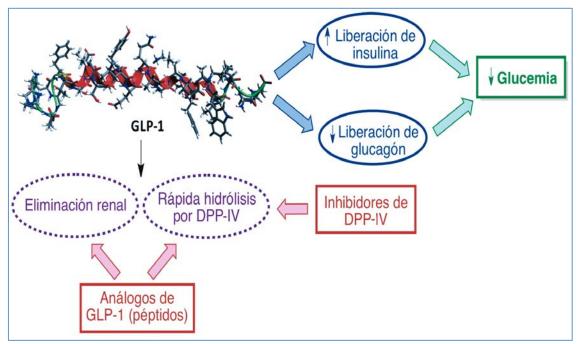


Figura 3.- Estrategias para el diseño de fármacos antidiabéticos basados en la acción hipoglucémica de las incretinas.

2. AGONISTAS NATURALES DEL RECEPTOR DE GLP-1

2.1. GPL-1

Las estructuras de las hormonas $GLP-1-(7-36)NH_2$ y GLP-1-(7-37) se representan en la Figura 4, en la que se ha indicado también el punto de ataque por DPP-IV. Como ya se ha indicado, su corta duración de acción hace inviable su empleo como fármacos, que sólo sería posible si se administraran por infusión continua. Por ser la principal hormona activa en humanos, a partir de aquí simplificaremos $GLP-1-(7-36)NH_2$ como GLP-1.

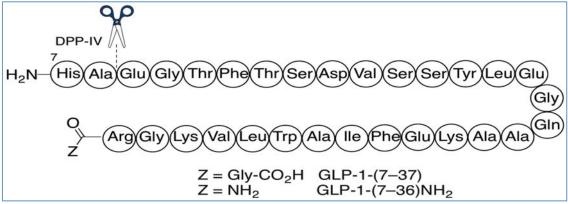


Figura 4.- Secuencia aminoacídica de las hormonas GLP-1, con indicación del enlace hidrolizado por DPP-IV.

Se ha determinado por difracción de rayos X la estructura del complejo que forman GLP-1 y el dominio extracelular de su receptor (18), que se muestra en la Figura 5a. Las principales interacciones polares afectan a los residuos de leucina 32 y valina 33 de la hormona, que interaccionan con la arginina 121 del receptor a través de sus grupos carbonilo pertenecientes al esqueleto del péptido, y a la lisina 26, que interacciona con el glutámico 128 del receptor. Además, son significativas algunas interacciones hidrofóbicas que afectan a los residuos triptófano 31 y fenilalanina 28 del péptido (Figura 5b). Cabe esperar que estos datos puedan emplearse en el futuro como base para el diseño de agonistas no peptídicos del receptor de GLP-1, un ámbito de investigación que está en sus inicios.

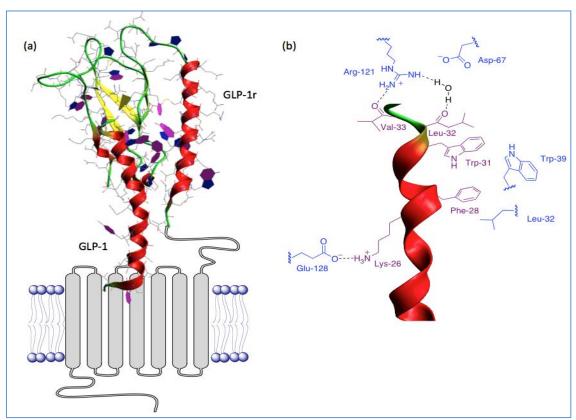


Figura 5.- (a) Estructura esquemática del complejo formado por GLP-1 y la porción extracelular de su receptor (pdb 3IOL, DOI:10.2210/pdb3iol/pdb). (b) Resumen de las principales interacciones entre GLP-1 y su receptor (¡Error! Marcador no definido.).

2.2. Exenatida (exendina 4)

Existe otro péptido natural capaz de activar el receptor de GLP-1, la exendina 4. Este compuesto se aisló de la saliva del lagarto *Heloderma suspectum*, conocido como "monstruo de Gila" (Figura 6) (19). Se trata de una de las dos especies conocidas de lagartos venenosos y habita zonas desérticas del sur de Estados Unidos y el norte de México, tomando su nombre del valle del río Gila, en Arizona, donde fue muy abundante. El monstruo de Gila se alimenta con muy poca frecuencia (entre 5 y 10 veces al año, en su hábitat natural), y entre dos comidas sucesivas tiene la capacidad de ralentizar su metabolismo y desactivar su páncreas. Cuando llega el momento de alimentarse de nuevo, segrega la hormona exendina 4,

que reactiva el páncreas y estimula la secreción de insulina. En 2005, la FDA aprobó el uso de la exenatida (nombre que recibió la exendina 4 de origen sintético) para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 que no pudiera controlarse con antidiabéticos orales, y fue comercializada como Byetta® por Amylin Pharmaceuticals. Esta hormona se administra dos veces al día por vía subcutánea, generalmente por inyección abdominal. Además de sus efectos en los niveles de glucosa en sangre, la exenatida tiene la ventaja de producir una significativa pérdida de peso, que es muy beneficiosa en la mayoría de los pacientes de diabetes de tipo 2 y se debe a que retrasa el vaciamiento gástrico e induce una sensación de saciedad.

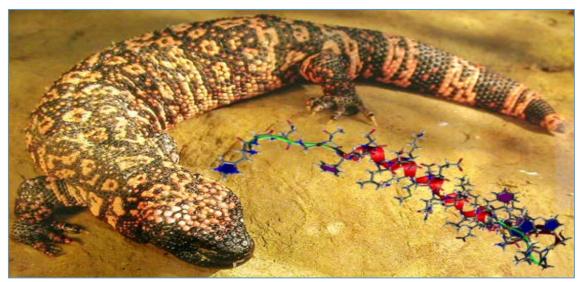


Figura 6.- El monstruo de Gila y la estructura tridimensional de la exendina 4 (pdb 1JRJ, DOI:10.2210/pdb1jrj/pdb).

La razón por la que la exendina 4 puede emplearse como fármaco, a diferencia de la hormona humana GLP-1, es que su semivida plasmática es de varias horas, lo que se debe a que es menos sensible a la hidrólisis por la DPP-IV que GLP-1. La comparación de las estructuras de ambos péptidos (Figura 7) revela una homología del 53%, y una diferencia crucial en el segundo aminoácido, que en la exendina 4 es glicina en lugar de alanina, lo que causa una interacción menos eficaz con el sitio activo de la dipeptidasa, probablemente como consecuencia de un cambio conformacional.

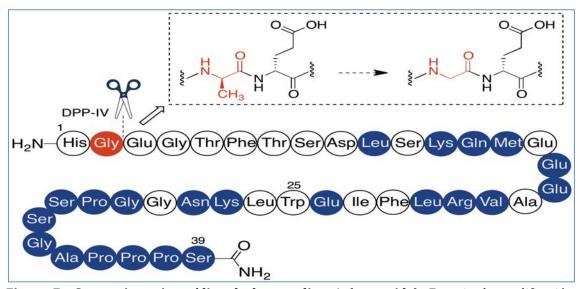


Figura 7.- Secuencia aminoacídica de la exendina 4 (exenatida). En rojo, la modificación respecto a GLP-1 que dificulta la hidrólisis por DPP-IV. En azul, otras diferencias existentes con GLP-1.

Aunque por el momento no han tenido una repercusión inmediata en el diseño de fármacos, mencionaremos que existen estudios tanto computacionales (20) como de difracción de rayos X (21) de la interacción de la exenatida con su receptor.

3. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE GLP-1

3.1. Taspoglutida

Inspirada en el modelo natural proporcionado por la exendina 4, una de las estrategias empleadas para incrementar la vida media de GLP-1 se basa en la sustitución del resto de alanina implicado en la hidrólisis por DPP-IV por otros aminoácidos. En este caso, se utilizó ácido 2-aminoisobutírico (AIB), el α-metil derivado de la alanina, que también reemplazó a la glicina 36 (Figura 8), lográndose un incremento en la estabilidad metabólica. Además, la taspoglutida se desarrolló como una formulación de liberación sostenida en la que estaba asociada a cloruro de zinc de forma que tras la inyección subcutánea se originaba un depósito a partir del cual se liberaba lentamente el fármaco, lo que permite administrarlo una vez por semana. Aunque los ensayos clínicos iniciales parecían indicar una buena efectividad en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 y una aceptable tolerancia, el estudio de fase III mostró que el tratamiento a largo plazo inducía en algunos pacientes reacciones en el lugar de inyección, problemas de hipersensibilidad y trastornos gastrointestinales de suficiente gravedad para que en 2010 se decidiera la suspensión del desarrollo de este compuesto, que no ha vuelto a reanudarse (22).

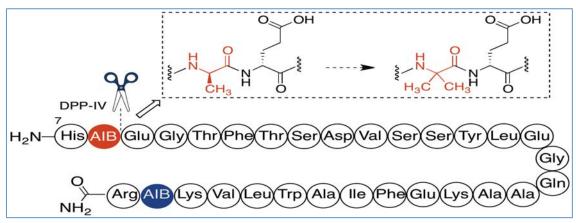


Figura 8.- Secuencia aminoacídica de la taspoglutida. En rojo, la modificación respecto a GLP-1 que dificulta la hidrólisis por DPP-IV. En azul, otra diferencia con GLP-1.

3.2. Conjugados de GLP-1 con albúmina

La mayor parte de las modificaciones de GLP-1 se han orientado a su asociación con moléculas de proteínas, principalmente albúmina (23). La albúmina es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, y una de sus funciones es el transporte de sustancias poco solubles en el plasma, como por ejemplo las hormonas tiroideas y los ácidos grasos, que se unen a una serie de bolsillos lipófilos existentes en las moléculas de albúmina. La existencia de estas zonas capaces de reconocer cadenas hidrocarbonadas de elevada longitud se ha aprovechado en el diseño de fármacos peptídicos de acción prolongada, especialmente derivados de insulina para el tratamiento de la diabetes. Mencionaremos como ejemplo la insulina detemir (Levemir®), en la cual se ha unido una cadena de ácido mirístico (C14) al grupo ε-amino del resto de Lys-29 de la hormona, y cuya acción prolongada se debe a que dicha cadena lipófila se enlaza de forma no covalente a alguno de los bolsillos lipófilos de la albúmina destinados al transporte de ácidos grasos. Por otra parte, la albúmina contiene numerosos aminoácidos portadores de grupos nucleófilos, como la lisina y la cisteína, lo que permite su unión covalente a grupos espaciadores adecuados, unidos a su vez al fármaco peptídico que se desea enlazar (24).

Ambas estrategias se han empleado en el diseño de análogos de GLP-1 de acción prolongada. En este caso concreto, además de retrasar la hidrólisis por dificultar el acceso de DPP-IV, la unión del péptido a moléculas de albúmina retrasa su eliminación renal, por dificultar la filtración glomerular al incrementarse la masa molecular.

3.2.1. Liraglutida y semaglutida

La liraglutida (NN2211), comercializada por Novo Nordisk comoVictoza®, es un primer ejemplo de un derivado de GLP-1 estabilizado por unión a seroalbúmina, lo que permite administrarla una vez al día. En este caso, la unión con la albúmina es de tipo no covalente, y tiene lugar gracias a la incorporación a la cadena lateral de la lisina 26 de una unidad de ácido palmítico a través de un

espaciador de ácido glutámico (Figura 9). El mecanismo de la prolongación de la acción es múltiple, ya que por un lado, tras su administración por vía subcutánea, el péptido experimenta un fenómeno de auto-asociación en el lugar de inyección, liberándose lentamente a partir del agregado formado. Por otra parte, una vez en plasma, la liraglutida se asocia con la seroalbúmina en más del 99%, gracias al reconocimiento de su cadena lipófila por cavidades hidrófobas de la albúmina, reduciendo su vulnerabilidad hacia DPP-IV y reduciendo su aclaramiento renal. La liraglutida ha demostrado algunas ventajas sobre otros tratamientos, ya que es menos inmunogénica que la exenatida. Sin embargo, también plantea algunos problemas de seguridad ya que se ha demostrado que en ratas, aunque probablemente no en humanos, está asociada a un incremento de riesgo de tumores de células C tiroideas, y también se han observado algunos casos de pancreatitis.

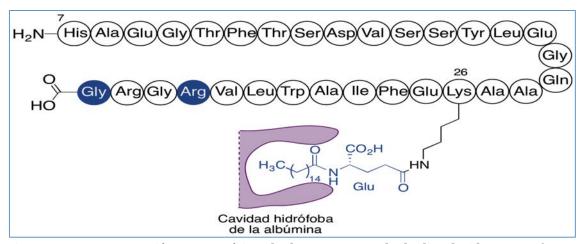


Figura 9.- Representación esquemática de la estructura de la liraglutida. En azul, sus diferencias con GLP-1 y la estructura de la cadena lipófila que permite su asociación con cavidades hidrófobas de la albúmina.

La semaglutida, también de Novo Nordisk, es un análogo de la liraglutida que se encuentra en fase III de desarrollo clínico y que presenta dos diferencias con el compuesto de referencia. En primer lugar, igual que se hizo en el caso de la taspoglutida, se ha reemplazado la segunda alanina por ácido 2-aminoisobutírico para aumentar la estabilidad frente a DPP-IV. Además, se ha alargado el espaciador como se indica en la Figura 10. La semivida plasmática de este fármaco es de 160 h., lo que permite administrarlo una vez por semana (25).

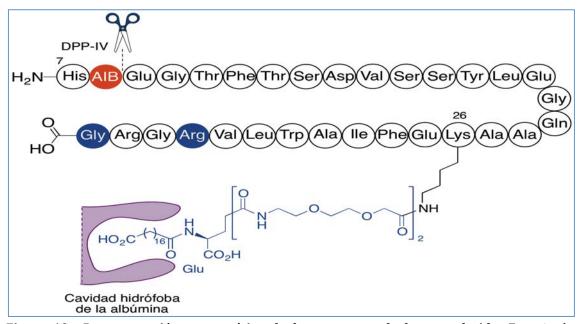


Figura 10.- Representación esquemática de la estructura de la semaglutida. En rojo, la modificación respecto a GLP-1 que dificulta la hidrólisis por DPP-IV. En azul, sus diferencias con GLP-1 y la estructura de la cadena lipófila que permite su asociación con cavidades hidrófobas de la albúmina.

3.2.2. Albiglutida (GSK716155, albugon)

La albiglutida es un fármaco antidiabético desarrollado inicialmente por Human Genome Sciences y adquirido posteriormente por GlaxoSmithKline, que contiene dos unidades de una GLP-1 modificada mediante la sustitución de alanina por glicina (la misma que existe en la exenatida). Estas unidades se encuentran unidas covalentemente y conjugadas con una molécula de albúmina por el extremo N-terminal de esta (Figuras 11 y 12). El motivo que llevó a emplear dos unidades de GLP-1 fue compensar la disminución en afinidad por el receptor GLP-1 que acompaña a la conjugación con albúmina, actuando la molécula de GLP-1 unida directamente a la albúmina como espaciador. Además, este tipo de estructura hace que la absorción de la albiglutida desde el lugar de inyección sea más lenta que otros conjugados con albúmina, posibilitando una administración semanal. La albiglutida se prepara por fusión delgen que expresa la albúmina humana dos copias del que expresa la hormona GLP modificada, y se encuentra en fase III de ensayo clínico.



Figura 11.- Secuencia aminoacídica de la albiglutida. En rojo, las diferencias con GLP-1.

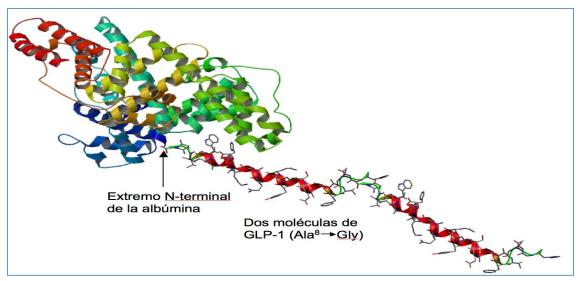


Figura 12.- Estructura tridimensional de la albiglutida, construida a partir de una molécula de albúmina humana (pdb 1E7I, DOI:10.2210/pdb1e7i/pdb) y dos de GLP-1 modificada.

3.2.3. CJC-1131 (DAC-GLP-1)

Este fármaco no se administra conjugado con albúmina, sino que constituye un ejemplo de aplicación de la metodología conocida como DAC (*Drug Affinity Complex*), desarrollada por la empresa Conjuchem. El péptido que se administra es GLP-1 humana de origen sintético, modificada por sustitución del segundo residuo de L-Ala por D-Ala, con objeto de dificultar su hidrólisis por DPP-IV. Además, se añadió al aminoácido C-terminal una lisina, cuyo grupo ε-amino se enlazó a través de un espaciador a un anillo de maleimida. Tras la administración subcutánea del fármaco y su llegada a sangre, se une covalentemente a una molécula de albúmina a través una adición de Michael de un grupo nucleófilo de la proteína al doble enlace electrófilo de la maleimida (Figura 13). La semivida plasmática de este compuesto se estimó en 15-19 días, lo que hubiera permitido acciones muy prolongadas. Sin embargo, Conjuchem interrumpió el desarrollo clínico de este

compuesto en favor de CJC-1134, un conjugado de exenetida que se comentará más adelante.

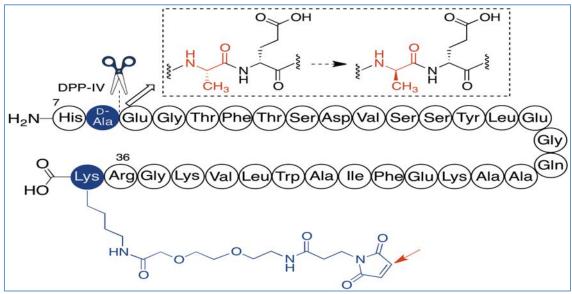


Figura 13.- Secuencia aminoacídica de CJC-1131. En rojo y azul se indican las diferencias con GLP-1. La flecha roja indica el átomo por el que se une a la albúmina mediante una adición de Michael, tras alcanzar el fármaco el torrente sanguíneo.

3.3. Otros conjugados de GLP-1

3.3.1. Conjugados con polietilenglicol: GLP-1 PEG (LY 2428757)

El polietilenglicol se ha utilizado a menudo para incrementar la semivida plasmática de fármacos peptídicos, ya que forma con ellos conjugados hidrófilos que ocupan un gran volumen en comparación con proteínas de peso molecular semejante y, a causa de este gran tamaño, no están sujetos a filtración glomerular. Por este motivo, Eli Lilly está estudiando un fármaco llamado GLP-1 PEG (LY 2428757), que es un derivado pegilado de GLP-1 (26) y que se encuentra en ensayos clínicos de fase II. Este fármaco requiere administración semanal y presenta la ventaja sobre otros conjugados de ser altamente hidrosoluble, lo que facilita su inyección. Su estructura, representada en la Figura 14, incluye el péptido GLP-1, un espaciador formado por siete aminoácidos y el polietilenglicol.

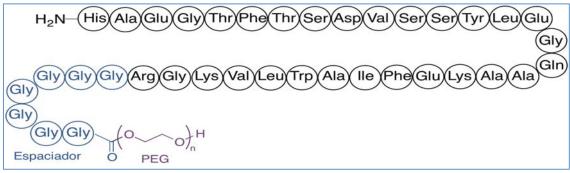


Figura 14.- Estructura de GLP-1 PEG (LY 2428757).

3.3.2. Conjugados con fragmentos Fc de inmunoglobulinas. Dulaglutida (GLP-Fc, LY2189265)

El tallo de las inmunoglobulinas está formado por proteínas conocidas como fracción constante (Fc). Esas proteínas pueden utilizarse para preparar conjugados con fármacos peptídicos, dando lugar a una duración de acción incrementada debido a disminución del aclaramiento renal asociada a un mayor peso molecular, así como a la interacción de las proteínas Fc con diversos receptores (27).

La aplicación de esta técnica de diseño a GLP-1 por parte de la empresa Lilly ha dado lugar a la dulaglutida, una proteína recombinante en la que el fragmento Fc de la inmunoglobulina Ig4 humana, a través de su región bisagra (hinge), está unido a dos moléculas de GLP-1 modificada, una por cada cadena Fc, a través de un espaciador peptídico formado por tres unidades de (Gly)₅Ser y una Ala terminal (Figura 15). La dulaglutida tiene una semivida plasmática de 4 días y está en fase II de ensayos clínicos como tratamiento de la diabetes por inyección subcutánea una vez a la semana (28).

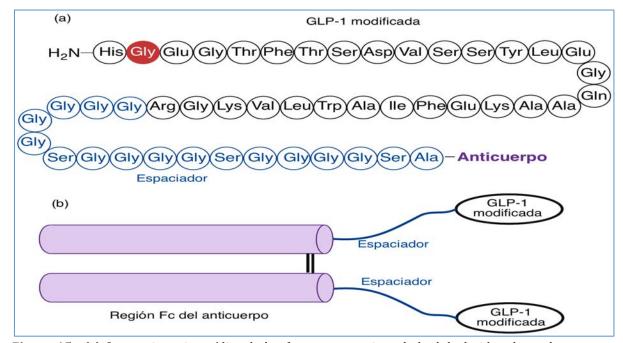


Figura 15.- (a) Secuencia aminoacídica de los fragmentos activos de la dulaglutida y las cadenas espaciadoras. (b) Representación esquemática de la estructura de la dulaglutida, donde se indica la unión de dos moléculas activas a la región bisagra de las cadenas Fc del anticuerpo.

4. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE EXENATIDA

4.1. Lixisenatida (ZP-10A, AVE-0010)

Es un análogo sintético de la exenatida, desarrollado por Sanofi/Zealand, cuyo extremo C-terminal se ha manipulado reemplazando los residuos Pro-38 y Ser-39 por Ser-38 y Lys-39, respectivamente, y además añadiendo un fragmento final de pentalisina (Figura 16). Este compuesto tiene una acción lo bastante prolongada para permitir su administración una vez al día, y ha demostrado en varios ensayos clínicos su eficacia como agente antidiabético, en monoterapia o en combinación con otros fármacos, así como producir pérdidas de peso significativas. Desde Febrero de 2013, está autorizada su comercialización por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como Lyxumia®, y la solicitud para su comercialización en Estados Unidos se encuentra en estudio por la FDA.

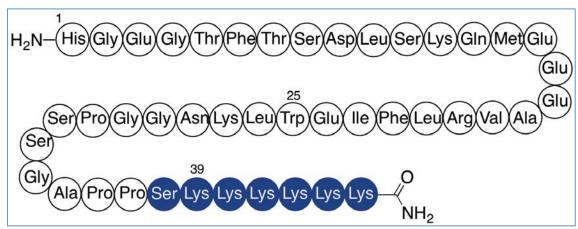


Figura 16.- Secuencia aminoacídica de la lixisenatida.

4.2. Conjugados de exenatida con proteínas

Análogamente a lo descrito para GLP-1, se han desarrollado varios conjugados de exenatida con macromoléculas, fundamentalmente proteínas, para protegerla de la hidrólisis por DPP-IV y retrasar su eliminación renal.

4.2.1. Conjugados con albúmina: CJC-1134-PC

Desarrollado por la empresa Conjuchem, este fármaco contiene una molécula de exenatida a la que se ha incorporado una lisina en el extremo C-terminal, de modo que su grupo ε-amino se utiliza para enlazar la hormona covalentemente a una cadena espaciadora que termina en un anillo de maleimida. Finalmente, la reacción del doble enlace electrófilo de este anillo con una molécula de albúmina tiene lugar específicamente por el residuo Cys-25, dando lugar a la especie conjugada que se administra (Figura 17). CJC-1134-PC se está ensayando en clínica para el tratamiento de la diabetes, con administración semanal.

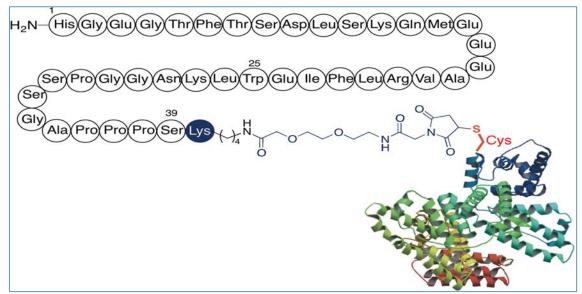


Figura 17.- Representación esquemática de la estructura de CJC-1134-PC.

4.2.2. Exenatida-XTEN (VRS-859)

El uso de polietilenglicol para incrementar la semivida de fármacos peptídicos, ya mencionado, tiene la desventaja de que no es fácilmente biodegradable por lo cual tiende a vacuolizarse en diversos tejidos, especialmente en los túbulos renales. Además, el polietilenglicol no es una especie química única, por lo cual los fármacos tratados de esta manera son mezclas de compuestos, lo que complica su caracterización.

Estas desventajas, y la similitud estructural entre el PEG y los polipéptidos (Figura 18), han llevado al desarrollo de péptidos artificiales con un comportamiento biológico similar al de PEG (desestructurados, elevado volumen hidrodinámico, buena estabilidad en plasma), pero que tienen la ventaja de ser biodegradables y de poder prepararse en estado puro.

Estos péptidos se conocen con el nombre de XTEN, y están formados por secuencias no repetitivas en las que se emplean preferentemente Ser, Ala, Pro, Thr, Glu y Gly, y se excluyen los aminoácidos con cadenas hidrofóbicas porque se considera que pueden favorecer plegamientos compactos y fenómenos de inmunogénesis a través de interacciones con anticuerpos (29), aunque las secuencias exactas de estos péptidos no han sido reveladas por Versartis, la empresa que los desarrolla. La aplicación de estas ideas ha dado lugar al fármaco VRS-859, un conjugado exenatida-XTEN desarrollado por Diartis Pharmaceuticals, que se administra una vez al mes y acaba de completar los ensayos clínicos de fase I.

Figura 18.- Analogía entre la estructura del polietilenglicol y la de la poliglicina.

4.2.3. Conjugados con fragmentos Fc de inmunoglobulinas

De forma análoga a lo descrito para GLP-1, esta técnica se ha aplicado a la exenatida por Hanmi Pharmaceuticals. Dicha empresa ha diseñado un sistema de transporte al que denomina LAPS, basado en la conjugación de la hormona a un fragmento Fc humano mediante un espaciador constituido por una cadena corta de polietilenglicol. Esta técnica ha sido aplicada tanto a la exenatida como a una hormona modificada llamada CA exenatida, dando lugar, respectivamente, a la langlenatida (exenatida-LAPS, HM11260C) y a HM11260A (30). Estos conjugados se diferencian de los desarrollados por Lilly para el caso de GLP-1 en la naturaleza del espaciador y en que en este caso solamente se utiliza una de las dos proteínas Fc, quedando la otra libre.

5. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA FORMULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE INCRETINAS

Además de la manipulación estructural de GLP-1 y exenatida y su conjugación con albúmina u otras proteínas, se están desarrollando en la actualidad otras formulaciones de estas hormonas, muchas de las cuales se encuentran en fase de ensayo clínico (31,32,33).

Recientemente se ha comercializado una formulación de liberación sostenida de la exenatida, conocida como exenatida LAR (*Exenatide Long-Acting Release*) o Bydureon®, que permite la administración del fármaco una vez por semana (34). Se basa en la encapsulación del principio activo en microesferas de un diámetro aproximado de 0,1 mm, fabricadas con un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (35,36). Una suspensión de estas microesferas se inyecta por vía subcutánea y, en contacto con el agua del tejido, se hidratan e hinchan, liberando

ya en esa fase pequeñas cantidades de hormona desde la superficie de las partículas.

Las microesferas empiezan entonces a degradarse por hidrólisis, liberando su contenido de forma lenta y sostenida (Figura 19). Los productos de la hidrólisis del polímero son biocompatibles y de hecho el ácido láctico se produce en el metabolismo humano y el metabolismo oxidativo del ácido glicólico (ácido 2-hidroxiacético) conduce a ácido glioxílico y posteriormente a ácido oxálico, otro intermedio metabólico habitual.

Se están investigando nuevas modificaciones en la formulación de las microesferas de exenatida. Así, el empleo de un diluyente formado por triglicéridos ha permitido la formulación de dosis mayores, lográndose prolongar aún más su duración de acción y pasar a una administración mensual, que está actualmente en fase II de ensayo clínico (37). Esta variante de la exenatida se conoce como ExQM, para diferenciarla de la de administración semanal (ExQW).

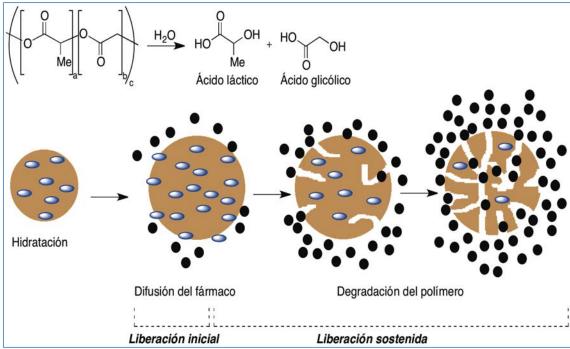


Figura 19.- Liberación sostenida de exenatida a partir de microesferas de un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico.

Intarcia Therapeutics investiga un implante subcutáneo llamado ITCA 650, que está basado en el dispositivo DUROS® (38). Consiste en un depósito cilíndrico de una aleación de titanio que en un extremo está cerrado por una membrana semipermeable a través de la cual, una vez insertado el dispositivo, entra agua y penetra en una disolución salina ("motor osmótico").

Esta se expande y mueve un pistón que a su vez lleva a cabo la administración del fármaco a través de un moderador de la difusión existente en el otro extremo del dispositivo (Figura 20). El dispositivo se inserta de forma subcutánea, normalmente en el espacio entre el bíceps y el tríceps, y es capaz de liberar su contenido a velocidad constante durante tiempos prolongados, por lo cual en la actualidad se está estudiando en clínica su empleo para la administración de exenatida en períodos de hasta un año (39).



Figura 20.- El dispositivo DUROS®.

Otra importante línea de investigación actual es el desarrollo de *formas de administración oral de las incretinas*. En el caso de GLP-1, Novo Nordisk está investigando un fármaco llamado NN9924, que se encuentra en fase I de desarrollo clínico y está basado en la tecnología Eligen®, de la que se conocen pocos detalles pero implica la inhibición de la degradación química y enzimática del péptido en el tracto digestivo, así como una interacción con la hormona que supone una "mejora transitoria de las propiedades de partición" de esta (40). En el caso de la exenatida, Oramed está estudiando ORMD-0901, cuya preparación se basa en el uso de una serie excipientes (no descritos por el fabricante) que al parecer protegen al ingrediente activo de la proteolisis intestinal y favorecen su absorción. Esta formulación, además de presentar las ventajas generales asociadas a la vía oral, no parece inducir náuseas, a diferencia de la exenatida inyectada, y se encuentra en fase II de ensayo clínico.

Como resumen de lo tratado hasta aquí, se reúnen en la Tabla 2 los principales datos de los principales agonistas peptídicos del receptor de GLP-1.

Tabla 2.- Resumen de los agonistas peptídicos del receptor de GLP-1.

Fármaco	Empresa	Situación	Nombre	Periodicidad de
	· •		comercial	inyección
Exenatida	Amylin	Comercializado	Byetta®	2 dosis/día
(exendina 4)	Pharmaceuticals-Eli			
	Lilly			
Taspoglutida	Roche	Abandonado en		1 dosis/semana
		Fase III		(con ZnCl ₂)
Liraglutida	Novo Nordisk	Comercializado	Victoza®	1 dosis/día
Semaglutida	Novo Nordisk	Fase III		1 dosis/semana
Albiglutida	GlaxoSmithKline	Fase III		1 dosis/semana
CJC-1131	Conjuchem	Abandonado en		
		Fase II		
GLP-1 PEG	Eli Lilly	Fase II		1 dosis/semana
Dulaglutida	Eli Lilly	Fase II		1 dosis/semana
Lixisenatida	Sanofi/Zealand	Comercializado	Lyxumia®	1 dosis/día
		(Europa)		
CJC-1134-PC	Conjuchem	Fase II		1 dosis/semana
Exenatida-XTEN	Versartis-Diartis	Fase I		1 dosis/mes
	Pharmaceuticals			
Exenatida-LAPS	Hanmi	Preclínico		
	Pharmaceuticals			
Exenatida LAR	Bristol-Myers Squibb	Comercializado	Bydureon®	1 dosis/semana
(ExQW)	y AstraZeneca			
Exenatida ExQM	Amylin	Fase II		1 dosis/mes
	Pharmaceuticals- Eli			
	Lilly			
Exenatida en	Intarcia Therapeutics	Fase II		1 implante/año
DUROS® (ITCA				
650)				
NN9924	Novo Nordisk	Fase I		GLP-1 oral
ORMD-0901	Oramed	Fase II		Exenatida oral

6. INHIBIDORES DE DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV

La dipeptidil dipeptidasa IV es una glicoproteína de membrana que presenta actividad de dipeptidil aminopeptidasa, llevando a cabo la degradación de péptidos que tienen una prolina o alanina en la penúltima posición del extremo N-terminal por escisión de un fragmento correspondiente a los dos últimos aminoácidos. Está expresada en la superficie de las células de la mayoría de los tejidos, siendo muy abundante en la médula espinal, en el intestino delgado y en el túbulo proximal del riñón.

Su ruptura proteolítica en la superficie de las células da origen a la forma soluble circulante Es una proteasa de serina, en cuyo dominio C-terminal se encuentra la triada catalítica Ser630-Asp708-His740 (41). Está implicada en

numerosas funciones fisiológicas, además de la regulación de la glucemia a través de la hidrólisis de las incretinas, ya que también interviene en la degradación de otros péptidos biológicos importantes como los péptidos pancreáticos (neuropéptidos Y, péptido YY), gran variedad de quimioquinas (CXCL9, CXCL11, CCL5) y la sustancia P, entre otros. Es parte de una familia de proteínas a la que pertenecen otras isoformas conocidas como DPP-VII, VIII y IX, cuya inhibición conduce a numerosos efectos secundarios, por lo que la inhibición selectiva de la isoforma IV es importante como criterio de diseño (42).

Los inhibidores de DPP-IV se clasifican según su estructura en dos grandes grupos: análogos al sustrato y no análogos al sustrato. Los primeros presentan generalmente estructuras semejantes a péptidos y se pueden unir a la enzima de manera covalente (cianopirrolidinas) o no covalente, mientras que los segundos se unen siempre de forma no covalente (43).

Al tratarse de moléculas no proteicas, su principal ventaja sobre los agonistas del receptor GLP-1 es que son activas por vía oral. Una diferencia importante entre ambos grupos es que los inhibidores de DPP-IV no afectan al peso corporal.

6.1. Derivados de pirrolidina

Los primeros inhibidores estudiados fueron los derivados de pirrolidina, debido a que la enzima muestra una gran especificidad por sustratos con un resto de prolina en la penúltima posición de la secuencia. El anillo de pirrolidina es portador de un sustituyente en su posición 2, cuya naturaleza determina que la unión a la enzima sea reversible o irreversible. Así, la presencia en dicha posición de grupos ciano, ácido borónico o hidrógeno proporciona inhibidores reversibles, mientras que grupos difenilfosfonato o restos de ácido O-acilhidroxámico hacen que la unión del inhibidor a la enzima sea irreversible (43).

Los inhibidores con estructura de 2-cianopirrolodina han sido los más estudiados, no sólo por su semejanza con la prolina sino porque muestran una potencia del orden nanomolar y, además, pueden ser administrados por vía oral (44). Tienen como principal inconveniente su falta de estabilidad en solución, ya que el compuesto experimenta un proceso de ciclación intramolecular que origina compuestos inactivos por ataque intramolecular del nitrógeno exocíclico al grupo ciano Esto obliga a introducir sustituyentes voluminosos que dificulten este ataque, bien en el nitrógeno exocíclico o bien en el carbono α (Figura 21). Otra manera de aumentar la estabilidad es fusionar un anillo de ciclopropano a la pirrolidina como en el caso de la saxagliptina, que se comentará más adelante.

Figura 21.- Estabilización de las 2-cianopirrolidinas por introducción de sustituyentes voluminosos.

Las 2-cianopirrolilidinas se unen de manera covalente al sitio activo de la DPP-IV mediante la formación de un imidato con el grupo OH de la Ser-630 que, además, está estabilizado por un enlace de hidrógeno con la Tyr-547. A pesar de ser covalente, esta unión es reversible debido a la baja estabilidad del imidato frente a la hidrólisis. Además, el grupo amino, ionizado a pH fisiológico, establece enlaces electrostáticos con los restos de Glu-205 y 206 (Figura 22). Los aminoácidos implicados en la interacción son esenciales para la actividad de la enzima, ya que el extremo N-terminal del péptido es fijado por interacciones con Glu-205 y 206 y a continuación Ser-630 ataca como nucleófilo al penúltimo enlace amídico del péptido.

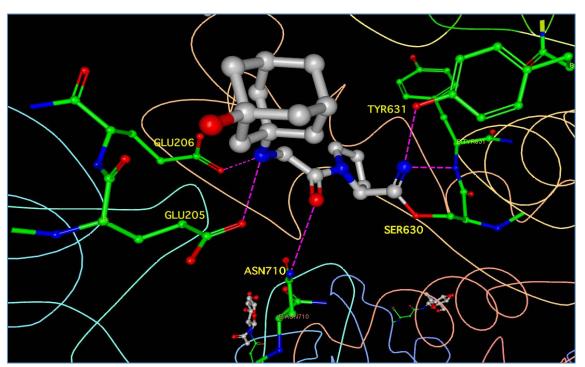


Figura 22 (a).- Interacciones de la vildagliptina con el sitio activo de DPP-IV. Representación realizada con el programa Ligand Explorer a partir de una estructura de difracción de rayos X (pdb 3W2T).

Figura 22 (b).- Formación de un enlace covalente entre las 2-cianopirrolidinas y el residuo Ser-630 deDPP-IV.

La tríada catalítica (Ser630, Asp708y His740) está contenida en una región conocida como bolsillo S1, que es relativamente pequeña e impide, en general, la presencia de sustituyentes voluminosos en la prolina. Además, existe una zona llamada bolsillo S2, próximo a los dos restos de glutámico 205 y 206 y formada por Val-207, Ser-209, Phe-357 y Arg-358, que permite alojar sustituyentes lipófilos voluminosos como los empleados para estabilizar la estructura frente a la ciclación (45). En la Figura 23 se indica la interacción de la vildagliptina con dichos bolsillos.

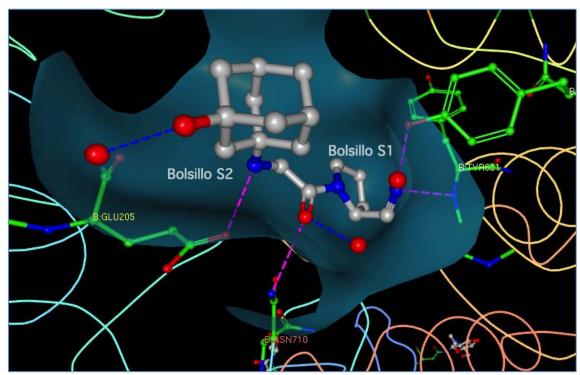


Figura 23.- Interacciones de la vildagliptina con el sitio activo de DPP-IV. Representación realizada con el programa Ligand Explorer a partir de una estructura de difracción de rayos X (pdb 3W2T).

Las principales cianopirrolidinas de uso terapéutico o en ensayo clínico avanzado se resumen en la Figura 24.

Figura 24.- Principales inhibidores de DPP-IV derivados de 2-cianopirrolidina.

Existe una segunda familia de derivados de pirrolidina en la que ya no está presente el grupo ciano, por lo que, en general, su unión es no covalente. La dutogliptina constituye una excepción, ya que su grupo de ácido borónico forma un enlace covalente, aunque reversible, con la serina 630. En la teneligliptina, el anillo de pirrolidina ha sido reemplazado por una tiazolidina bioisóstera (Figura 25).Los inhibidores no análogos al sustrato comprenden un amplio grupo de compuestos con estructuras muy diversas, que han surgido de programas de *high-throughput screening*. Todos ellos presentan un anillo aromático en lugar del anillo de pirrolidina y se unen de manera no covalente a la enzima. Se resumen los más importantes en la Figura 26.

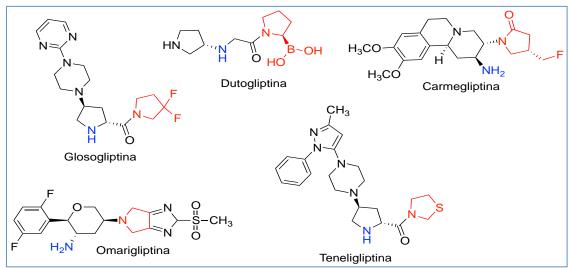


Figura 25.- Otras pirrolidinas y heterociclos relacionados que inhiben DPP-IV.

Figura 26.- Inhibidores de DPP-IV sin analogía con su sustrato endógeno.

El estudio de la interacción de estas nuevas familias de inhibidores ha llevado a la conclusión de que todos los inhibidores se unen a los bolsillos S1 y S2 previamente descritos para el caso de las cianopirrolidinas, pero existen algunos sitios de unión adicionales, llamados bolsillos S1', S2'y S2 extendido (46). En función de los sitios ocupados, se han descrito tres modos diferentes de unión, que se resumen en la Figura 27 junto con un ejemplo representativo de cada uno. En la Figura 28 se representa la estructura de rayos X de un complejo entre la enzima e inhibidores representativos de los tipos 2 y 3.

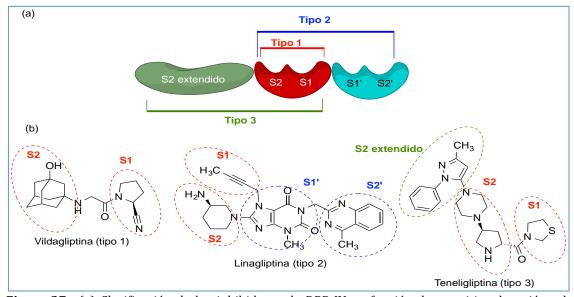


Figura 27.- (a) Clasificación de los inhibidores de DPP-IV en función de sus sitios de unión a la enzima. (b) Ejemplos representativos de cada uno de los tipos de inhibidores

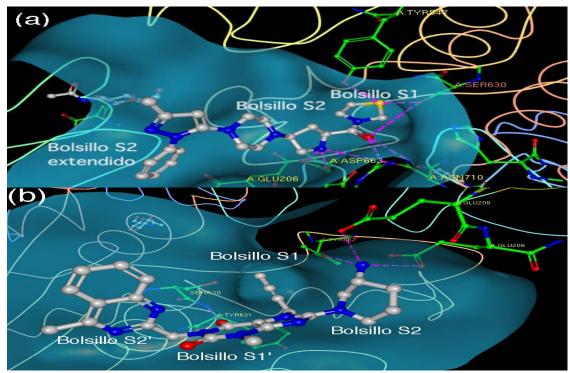


Figura 28.- Interacción de la teneligliptina (a) y la linagliptina (b) con las cavidades del sitio activo de DPP-IV. Representación realizada con el programa Ligand Explorer a partir de las correspondientes estructuras de difracción de rayos X (pdb 3WJK y 2RGU, respectivamente).

En la Tabla 3 se resumen algunos datos de los principales inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV.

Tabla 3.- Resumen de los principales inhibidores de DPP-IV.

Fármaco	Empresa	Situación	Nombre comercial
1. Derivados de 2-ciar	l nopirrolidina	ı	comerciai
Vildagliptina	Novartis (2007)	Comercializado	Galvus®,
			Zomelis®
Saxagliptina	Bristol-Myers	Comercializado	Onglyza®
(clorhidrato)	Squibb/AstraZeneca (2010)		
Anagliptina	Sanwa Kagaku Kenkyusho/	Comercializado	Suiny [®]
	Kowa (2012)	(Japón)	
Melogliptina (GRC-	Glenmark	Fase III	
8200)			
Bisegliptina	Kyorin/ActiveX	Fase II	
(KRP-104)			
Denagliptina	GlaxoSmithKline	Abandonado en	
(GW823093C)		Fase III	
ABT-279	Abott		
2. Otras pirrolidinas			
Teneligliptina	Mitsubishi Tanabe	Comercializado	Tenelia®
(bromhidrato)	Pharma/Daiichi Sankyo		
Glosogliptina	Pfeizer	Fase III	
(PF 00734200)			
Dutogliptina	Phenomix Corporation/Forest	Abandonado en	
(PHX1149)	Labs	Fase III	

Fármaco	Empresa	Situación	Nombre comercial
Carmegliptina (R1579)	F Hoffman-La Roche	Fase II	
Omarigliptina (MK-3102)	Merck	Fase III	
3. Inhibidores sin ana	logía con el sustrato		
Sitagliptina (fosfato)	Merck	Comercializado	Januvia®
Linagliptina	Boehringer Ingelheim Eli Lilly	Comercializado	Trajenta®, Tradjenta®
Gemigliptina	LG Life Sciences	Comercializado (Corea)	Zemiglo®
Alogliptina (benzoato)	Takeda	Comercializado	Nesina®
Trelagliptina (SYR- 472)	Takeda	Fase III	

7. TENDENCIAS FUTURAS

Además de que se deben esperar nuevos avances en las aproximaciones comentadas en los apartados anteriores, existen algunas líneas de investigación adicionales que probablemente conduzcan en el futuro a nuevos agentes antidiabéticos mejorados, y que se estudiarán brevemente en este apartado.

7.1. Agonistas no peptídicos del receptor de GLP-1

Una aproximación terapéutica que permitiría superar las limitaciones asociadas a la naturaleza peptídica de los fármacos actuales es el desarrollo de agonistas no peptídicos del receptor de GLP-1. Este receptor pertenece al tipo B₁ de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein-coupled receptors*) que se caracterizan por poseer siete lazos de transmembrana y que, a diferencia de los del tipo A, en los que actúan alrededor del 40% de los fármacos en el mercado (47), no son fáciles de explotar como dianas en el descubrimiento de fármacos. No obstante, se han identificado algunas moléculas pequeñas capaces de activar el receptor de GLP-1 (48), de los que se representan dos ejemplos en la Figura 29. La primera de ellas fue T-0623, pero el más avanzado de estos compuestos parece ser Boc5, que ha demostrado actividad antidiabética *in vivo* (49).

Figura 29.- Algunos agonistas no peptídicos de GLP-1.

7.2. Hormonas peptídicas multidiana

Además de GLP-1, existen otras hormonas digestivas capaces de regular la homeostasis de la glucosa y la ingesta de alimento, especialmente la oxintomodulina (un péptido formado por los 29 aminoácidos del glucagón más 8 residuos adicionales en el extremo C-terminal), la incretina GIP (*Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide*) y el péptido YY (PYY). Esto ha conducido a la idea de combinar los efectos de dos o tres de esas hormonas en un solo péptido. Citaremos como ejemplo Mar-701 (RO-6807952) y Mar (RO-6811135), derivados pegilados de fármacos peptídicos cuyas secuencias reúnen las de GLP-1 y GIP (50).

7.3. Moléculas pequeñas que estimulan la liberación de GLP-1: Agonistas de los receptores GPR119 y TGR5

Por ultimo, mencionaremos dos vías indirectas para aumentar los niveles de GLP-1 por incremento de su secreción aprovechando varios mecanismos. Uno de ellos consiste en el empleo de agonistas del receptor GPR119 (G-protein coupled receptor 119), que tiene la ventaja respecto al receptor de GLP-1 de pertenecer a la familia A de receptores acoplados a proteínas G y ser, por tanto, más propicio para el desarrollo de agonistas con estructura de molécula pequeña. Estos receptores están presentes en las células K y L intestinales, donde su activación induce, respectivamente, la secreción de GIP y GLP-1. Además, existen también en la membrana de las células β pancreáticas, donde estimulan la secreción de insulina. En una aproximación alternativa, puede recurrirse a la activación de los receptores TGR5 (GPBAR1, M-BAR), que también son miembros de la familia A de receptores acoplados a proteínas G y que parecen tener ácidos biliares como ligandos naturales. Estos receptores están presentes en la membrana de las células L, estimulando también la secreción de GLP-1 (Figura 30).

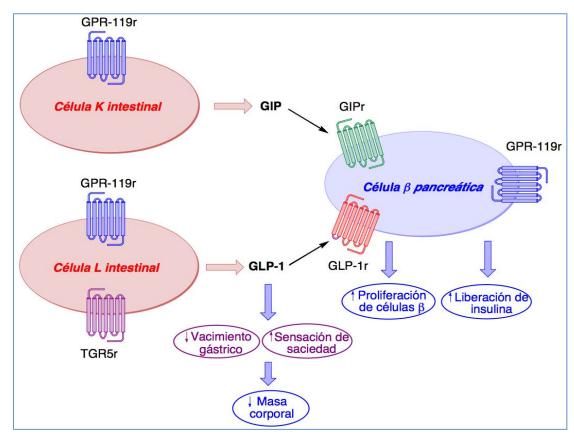


Figura 30.- Mecanismos indirectos para estimular la liberación de GLP-1.

Existen varios tipos de moléculas pequeñas que se comportan como agonistas del receptor GPR119 (51). Entre ellas, destacaremos MBX-2982, de Metabolex,y GSK-122263, de Glaxo Smith Kline, que se encuentran en ensayos clínicos de fase II (Figura 31). También se está investigando la combinación de agonistas de GPR119 con inhibidores de DPPP-IV (52). En cuanto a los agonistas de TGR5, mencionaremos XL475, de Exelixis/Bristol-Myers Squibb, cuya estructura no ha sido revelada (53).

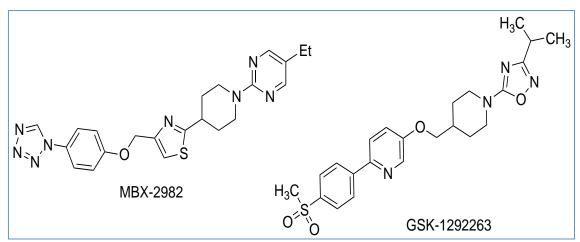


Figura 31.- Algunos agonistas del receptor GPR119.

8. CONCLUSIONES

Aunque existen todavía aspectos sin resolver, la aproximación basada en el incremento de la actividad de las incretinas por vías directas o indirectas constituye una de las vías más prometedoras para el tratamiento futuro de la diabetes de tipo 2, uno de los mayores problemas sanitarios a los que se enfrenta la sociedad actual.

9. REFERENCIAS

- 1. Verspohl, E. J. (2012). Novel pharmacological approaches to the treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol. Rev.* 64, 188–237.
- 2. Pandey, R.; Kumar, N.; Yadav, M.; Nagpal, R.; Jain, S.; Yadav, M. (2013). Anti-diabetic compounds and their patent information: An update. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 7, 35-48.
- 3. Israili, Z. H. (2011). Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* 18, 117-152.
- 4. Drucker, D. J. The web site devoted to the study of the glucagon-like peptides, http://www.glucagon.com (consultado el 02-08-2013).
- 5. Kazakos, K. (2011). Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. Diabet. Res. Clin. Pr. 93S, S32-S36.
- 6. Vahl, T. P.; Paty, B. W.; Fuller, B. D.; Prigeon, R. L.; D'Alessio, D. A. (2003). Effects of GLP-1-(7–36)NH₂, GLP-1-(7–37), and GLP-1-(9–36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88, 1772–1779.
- 7. Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics***2012**, *4*: 17.
- 8. Sinclair, E. M.; Drucker, D. J. (2005). Proglucagon-derived peptides: Mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology* 20, 357–365.
- 9. Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. Cell Metabol. 3, 153-165
- 10. Elashoff, M.; Matveyenko, A. V.; Gier, B.; Elashoff, R.; Butler, P. C. (2011). Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with Glucagon-Like Peptide-1-based therapies. *Gastroenterology* 141, 150–156.
- 11. Cho,Y- M.; Merchant, C. E.; Kieffer, T. J. (2012). Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacol. Ther.* 135, 247–278
- 12. Meier, J. J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus (2012). *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 728-742.
- 13. Yi, F.; Li, D.; Ma, W.; Du, Q. (2013). GLP-1 biology and GLP-1 based antidiabetic therapy. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 22, 7-27.
- 14. Lorenz, M.; Evers, A.; Wagner, M. (2013). Recent progress and future options in the development of GLP-1 receptor agonists for the treatment of diabesity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 4011–4018.
- 15. Weber, A. E. (2004). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J. Med. Chem.* 47, 4135-4141.
- 16. Chyan, Y. J.; Chuang, L. M. (2007). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: An evolving treatment for type 2 diabetes from the incretin concept. *Rec. Pat. Endocr. Metabol. Immun. Drug Discov.* 1, 15-24.
- 17. Pei, Z. From the bench to the bedside: Dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a new class of oral antihyperglycemic agents. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11, 512-532.
- 18. Underwood, C. R.; Garibay, P.; Knudsen, L. B.; Hastrup, S.; Peters, G. H.; Rudolph, R.; Reedtz-Runge, S. (2010) Crystal structure of Glucagon-Like Peptide-1 in complex with the extracellular domain of the Glucagon-Like Peptide-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 723–730.
- 19. Eng, J.; Kleinman, W. A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J. P. (1992). Isolation and characterisation of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom: Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 267, 7402–7405.

- 20. Kirkpatrick, A.; Heo, J.; Abrol, R.; Goddard III, W. A. (2012). Predicted structure of agonist-bound glucagon-like peptide 1 receptor, a class B G protein-coupled receptor. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 19988–19993.
- 21. Runge, S.; Thøgersen, H.; Madsen, K.; Lau, J.; Rudolph, R. (2008) Crystal structure of the ligand-bound Glucagon-Like Peptide-1 receptor extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 283, 11340-11347.
- 22. Rosenstock, J.; Balas, B.; Charbonnel, B.; Bolli, G. B.; Boldrin, M.; Ratner, R.; Balena, R. (2013) The fate of taspoglutide, a weekly GLP-1 receptor agonist, versus twice-daily exenatide for type 2 diabetes: The T-emerge 2 trial. *Diabet. Care* 36, 498-504.
- 23. Garber, A. J. (2011). Long-acting Glucagon-Like Peptide 1 receptor agonists. *Diabet. Care* 34(S2), S-279-S284.
- 24. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles (2008). *J. Control. Release* 132, 171-183.
- 25. Nauck, M.; Petrie, J. R.; Sesti, G.; Mannucci, E.; Courreges, J.-P.; Atkin, R.; Düring, S.; Jensen, M.; Heller, C. B. (2012). The once-weekly human GLP-1 analogue semaglutide provides significant reductions in HbA1c and body weight in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 55 (Suppl. 1), S7.
- 26. http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00804986 (consultado el 07-08-2013).
- 27. Czajkowsky, D. M.; Hu, J.; Shao, Z.; Pleass, R. J. (2012). Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives *EMBO Mol. Med.* 4, 1015–1028.
- 28. Glaesner, W.; Vick, A. M.; Millican, R.; Ellis, B.; Tschang, S. H.; Tian, Y.; Bokvist, K.; Brenner, M.; Koester, A.; Porksen, N.; Etgen, G.; Bumol, T. (2011). Engineering and characterization of the long-acting Glucagon-Like Peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26, 287–296.
- 29. Schellenberger, V.; Wang, C. W.; Geething, N. C.; Spink, B. J.; Campbell, A.; To, W.; Scholle, M. D.; Yin, Y.; Yao, Y.; Bogin, O.; Cleland, J. L.; Silverman, J.; Stemmer, W. P. C. (2009). A recombinant polypeptide extends the *in vivo* half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat. Biotechnol.* 27, 1186 1190.
- 30. http://www.abstractsonline.com/plan/ViewAbstract.aspx?mID=3217&sKey=0687e7c8-c97d-442b-92ec-ae505e051854&cKey=66ccf402-dd78-4894-8cae-b259fba97022&mKey=%7B89918D6D-3018-4EA9-9D4F-711F98A7AE5D%7D (consultado el 12-08-2013).
- 31. Russell-Jones, D.; Gough, S. (2012). Recent advances in incretin-based therapies. *Clin. Endocrinol.* 77, 489–499.
- 32. Sivertsen, J.; Rosenmeier, J.; Holst, J. J.; Vilsbøll, V. (2012). The effect of Glucagon-Like Peptide 1 on cardiovascular risk. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 209-222.
- 33. Cai, Y.; Wei, L.; Ma, L.; Huang, X.; Tao, A.; Liu, Z.; Yuan, W. (2013). Long-acting preparations of exenatide. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013:7 963–970.
- 34. Ballav, C.; Gough, S (2012). Bydureon: long-acting exenatide for once-weekly injection. *Prescriber* 23, 30-33.
- 35. Krause, A. (2011). Exenatide LAR: A sustained-release formulation of exenatide for the treatment of type 2 diabetes. *Formulary* 45, 43-51.
- 36. DeYoung, M. B.; MacConell, L.; Sarin, V.; Trautmann, M.; Herbert, P. (2012). Encapsulation of exenatide in poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres produced an investigational long-acting once-weekly formulation for type 2 diabetes. *Diabet. Technol. Ther.* 13, 1145-1154.
- 37. http://clinicaltrials.gov/show/NCT01104701 (consultado el 20-08-2013).
- 38. Rohloff, C. M.; Alessi, T. R.; Yang, B.; Dahms, J.; Carr, J. P.; Lautenbach, S. D. (2008). DUROS® technology delivers peptides and proteins at consistent rate continuously for 3 to 12 months. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2, 461-467.
- 39. Henry, R. D.; Rosenstock, J.; Logan, D. K.; Alessi, T. R.; Luskey, K.; Baron, M. A. (2013). Randomized trial of continuous subcutaneous delivery of exenatide by ITCA 650 versus twice-daily exenatide injections in metformin-treated type 2. *Diabetes Care* 36, doi: 10.2337/dc12-2410.
- 40. http://www.emisphere.com/barriers_oral_delivery.html (consultado el 02-08-2013).
- 41. Thoma, R.; Löffler, B.; Stihle, M.; Huber, W.; Ruf, A.; Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human Dipeptidyl Peptidase-IV. *Structure* 11, 947–959.

- 42. Gabhe, N.; Tasgoankar, R.; Dagade, B.; Rao, D.; Sawant, P.; Shirodkar, A. (2013). Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibition: A novel approach for the treatment of type II diabetes mellitus. *Int. J. Pharm. Sci.* 4, 629-637.
- 43. Gupta, R.; Walung, S. S.; Tokala, R. K.; Parsa, K. V. L.; Singh, S. K.; Pal, M. (2009). Emerging drug candidates of dipeptidyl peptidase IV (DPPP-IV) inhibitor class for the treatment of type II diabetes. *Curr. Drug Targets* 10, 71-87.
- 44. Peters, J. W. (2007). 11 Years of cyanopyrrolidines as DPP-IV inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 579-595.
- 45. Thoma, R.; Löffler, B.; Stihle, M.; Huber, W.; Ruf, A.; Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure*, 11, 947–959.
- 46. Nabeno, M.; Akahoshi, F.; Kishida, H.; Miyaguchi, I.; Tanaka, Y.; Ishii, S.; Kadowaki, T. (2013). A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 191–196.
- 47. Grigoriadis, D. E.; Hoare, S. R. J.; Lechner, S. M.; Slee, D. H.; Williams, J. A. (2009). Drugability of extracellular targets: discovery of small molecule drugs targeting allosteric, functional, and subunit -selective sites on GPCRs and ion channels. *Neuropsychopharmacology* 34, 106–125.
- 48. Willard, F. S.; Bueno, A. B.; Sloop, K. W. (2012). Small molecule drug discovery at the Glucagon-Like Peptide-1 receptor. *Exptl. Diabet. Res.*, article ID 709893, doi:10.1155/2012/709893.
- 49. He, M.; Guan, N.; Gao, W. W.; Liu, Q.; Wu, X.-Y.; Ma, D. W.; Zhong, D. F.; Ge, D. B.; Li, C.; Chen, X. Y.; Yang, L.; Liao, J. Y.; Wang, M. W. (2012) A continued saga of Boc5, the first non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist with in vivo activities. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 148–154.
- 50. http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01676584 (consultado el 05-08-2013).
- 51. Zhu, X.; Huang, W.; Qian, H. (2013). GPR119 agonists: A novel strategy for type 2 diabetes treatment, en Oguntibeju, O. O. *Diabetes mellitus Insights and perspectives*, capítulo 4. Intech Open Science.
- 52. Ansarullah, L. Y.; Holstein, M.; DeRuyter, B.; Rabinovitch, A.; Guo, Z. (2013) Stimulating b-Cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-IV inhibitor. *PLoS ONE* 8(1), e53345. doi:10.1371/journal.pone.0053345.
- 53. Mattei, P. Potent and selective, orally active GPBAR1 agonists as chemical biology probes. http://www.maggichurchouseevents.co.uk/bmcs/Downloads/GPCRs%20-%20Tue%200905%20Mattei%20 Patrizio%20 presentation.pdf (consultado el 05-08-2013).

ARTÍCULO

Reduction in mitochondrial membrane peroxidizability index and protein lipoxidation levels in the rat heart after ßadrenergic receptor signaling interruption with the ß-blocker atenolol

Alexia Gómez¹, Inés Sánchez Román¹, José Gómez¹, Alba Naudi², Charumati Pushparaj², Manuel Portero-Otin², Mónica López-Torres¹, Reinald Pamplona², Gustavo Barja*¹

Recibido el 18 de junio de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, № 4 (2013), pag. 613-633

ABSTRACT

A new mammalian longevity model based on ß-adrenergic signaling interruption at the level of adenylyl cyclase has reported decreased bone and heart aging and mean and maximum longevity increases in AC5KO mice (1). We decided to mimic this model in male Wistar rats treated with the ß-blocker atenolol in the drinking water and to check if an oxidative stress decrease could be involved. Atenolol treatment did not modify heart mitROS generation rate and mitDNA oxidative damage but significantly decreased global peroxidizability index of mitochondrial membranes, as well as protein lipoxidation, probably mediated by changes in elongases and desaturases activities.

Keywords: Oxidative stress; β-blocker; Lipid damage.

RESUMEN

Reducción en el índice de peroxidizabilidad de la membrana mitocondrial y niveles de lipoxidación proteícos en el corazón de la rata después de la interrupción de la señalización del receptor betaadrenérgico con el betabloqueante atenolol

Un nuevo modelo de longevidad en mamíferos basado en la interrupción de la vía de señalización beta-adrenérgica a nivel de la adenilato ciclasa ha revelado una

¹Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, Madrid 28040, Spain ²Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Lleida-IRBLleida, Lleida 25008, Spain.

^{*} Corresponding author: Prof. G. Barja. Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, c/Antonio Novais nº 2, Madrid 28040, Spain. e-mail: gbarja@bio.ucm.es

ralentización del envejecimiento del corazón y el hueso de ratones AC5KO y un incremento de su longevidad media y máxima (1). Decidimos mimetizar este modelo en ratas Wistar utilizando atenolol en el agua de bebida para comprobar si un descenso de estrés oxidativo podría estar implicado. El tratamiento no modificó la tasa de generación de radicales y el daño oxidativo al ADN del corazón, pero si redujo el índice de peroxidizabilidad y la lipoxidación proteica de las membranas mitocondriales, probablemente debido a cambios en las actividades elongasas y desaturasas.

Palabras clave: Estrés oxidativo; β-bloqueante; Daño lipídico.

1. INTRODUCTION

The mitochondrial free radical theory of aging is currently supported by both experimental and comparative studies. From these comparative studies, there are two main factors that can contribute to explain the lower aging rate of long-lived species: a low generation rate of mitochondrial reactive oxygen species (mitROS) (2,3) and a low membrane fatty acid unsaturation degree (4,5).

Experimental manipulations like dietary or caloric restriction (CR), protein restriction and methionine restriction (metR) increase longevity in different kind of animals mainly decreasing the mitROS generation rate (6-9), whereas these manipulations show minor effects on the fatty acid unsaturation degree in most of these cases (10).

However, modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity in C. elegans mutants, by reduction in lipid peroxidation substrates and shortening fatty-acid chain length to maintain membrane fluidity (11). The relationship between membrane fatty acid composition and longevity has been observed in all the animal models studied, including mammals, birds, rodents, honeybees and humans (12,13). A lower total number of double bounds of membrane fatty acids makes these molecules more resistant to lipid peroxidation. Highly unsaturated fatty acids like arachidonic acid (20:4n-6) and specially docosahexaenoic acid (22:6n-3) exhibit the highest sensitivity to ROS induced oxidative damage, their sensitivity increases as a function of the number of double bonds per fatty acid molecule (14,15) and long-lived animal species strongly avoid their presence in their tissue cellular membranes through tight homeostatic species-specific regulation. (5,13,16)

Different mammalian models of extended lifespan by gene-mutation have been recently described (17,18). Most of them are related to insulin/IGF-1-like signaling pathways (19), but there are others like ribosomal S6 protein kinase 1 (S6K1) (20) and AC5KO (1) that can also increase medium and maximum longevity.

In the AC5KO model, extension of lifespan in 129/SvJ-C57BL/6 mice has been obtained through the disruption of the β -adrenergic receptor signaling at the Type 5 adenylyl cyclase (AC5) level (1). This AC5KO knockout mouse showed increased mean and maximum longevity, from 25 to 33 months and from 33 to 37 months, respectively; and also showed improvements in the cardiomyopathy and bone deterioration related to aging. The disruption of AC5 preserved cardiac function in response to chronic pressure-overload and catecholamine stress, which is known to play a major role in heart failure development (21). These improvements seemed to be signaled in the cell due to an increase in the Raf/MEK/ extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway as suggested by increases in the amount of the p-MEK and p-ERK in various tissues, including heart, of AC5 KO mice (1). These mice also had higher levels of the antioxidant enzyme manganese superoxide dismutase (MnSOD) in heart, kidney and brain, suggesting that a decrease in oxidative stress could be involved in the mechanisms responsible for the aging delay effect.

Taking all these into account, it was interesting to test if the two main oxidative stress-linked factors related to longevity, the mitROS generation rate and the fatty acid unsaturation degree, were also lowered in animals with β-adrenergic receptor blocking. Atenolol is a second generation β-blocker with selectivity for cardiac β1 receptors. β1 receptors are predominantly located in cardiac tissue and primarily stimulated by norepinephrine; they are coupled to AC through a stimulatory G protein. From the different AC subtypes, AC5 is the main type in cardiac tissue. Therefore, blocking the β1-receptors can afford a fast and convenient model that could potentially mimic the phenotype of the AC5KO rodents. In the present study we tested the effect of the β1-selective blocker atenolol in Wistar rats (genetically heterogeneous animals, like human beings) to investigate if this drug also increases Raf/MEK/ERK signaling and whether or not the beneficial effects of β1-receptor blocking are also due to decreases in oxidative stress as it has been initially suggested.(1) We hypothesized that atenolol also increases Raf/MEK/ERK signalling in rats and that the mechanism responsible for its effects includes lowering one or both known factors related to longevity: mitROS production and the degree of fatty acid unsaturation. The possible beneficial effects of atenolol could be important because atenolol treatment in humans would be easier to implement than dietary restriction models.

In the present investigation, and for that purpose, we measured the mitochondrial ROS generation rate, mitochondrial oxygen consumption in states 4 (resting) and 3 (phosphorylating), the percent free radical leak (%FRL) in the respiratory chain, the respiratory complex I to IV amounts, and the content of the antioxidant enzyme MnSOD. We also studied the apoptosis-inducing factor (AIF) because it can stimulate apoptosis, but it is also required for the

assembly/maintenance of complex I (22), the respiratory complex at which mitROS generation is lowered in long-lived animals (23) as well as in rats subjected to dietary restriction (24). The marker of oxidative damage to mitochondrial DNA (mtDNA) 8-oxo-7,8-dihydro-2o-deoxyguanosine (8-oxodG) was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), and five oxidative damage markers of protein oxidation -the specific protein carbonyls glutamic and aminoadipic semialdehydes (GSA and AASA) indicating purely protein oxidative modification, the protein glycoxidation markers carboxyethyl lysine (CEL) and carboxymethyl lysine (CML), and the protein lipoxidation marker malondialdehyde lysine (MDAL) were measured in the rat heart by highly specific and sensitive mass spectrometry techniques. 8-oxodG in mtDNA (25) and MDAlysine (26) are known to be correlated to longevity also and in the correct sense. We also measured the full fatty acid composition of heart mitochondria membranes to calculate the global degree of unsaturation, and because protein lipoxidation is secondarily influenced by lipid peroxidation, which strongly depends on membrane fatty acid unsaturation degree. Additionally, we estimated the elongase and desaturase activities to determinate their role in the acyl chain length and trying to clarify the mechanism responsible for putative changes in the fatty acid unsaturation level elicited by atenolol.

Finally, in our study we decided to analyze SIRT3 and SIRT5 in order to clarify if they could be involved in the signaling mechanisms resulting in the lifeextending effect of ß-adrenergic receptor blocking. Sirtuin proteins initially identified in lower organisms seem to be also implicated in cellular signaling of longevity extension in mammals. Seven sirtuins (SIRT1-7) have been described in mammals (27) and they seem to have important roles in aging, stress resistance and metabolic regulation. In the present experiment, we have analyze SIRT3 and SIRT5, due to their localization at mitochondria. Beyond other metabolic actions, SIRT3 has been recently shown to control the levels of mitROS by multiple mechanisms, it is induced by DR and it has been proposed that these increases lower the rate of mitROS production (28). SIRT5 is located in the mitochondrial matrix and intermembrane space, and it can deacetylate cytochrome c, a protein of the mitochondrial intermembrane space with a central function in oxidative metabolism, as well as apoptosis (29). Most of the parameters measured in this investigation have not been assayed in the AC5KO longevity-extended model. Therefore, the present study can contribute to clarify whether mitochondrial or membrane oxidative stress is involved in the mechanism responsible for the increased life span elicited by β -adrenergic blockade.

2. MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Six week-old male Wistar rats were obtained from Harlan Laboratories (Unide, Italy). The animals were caged individually and maintained in a 12:12 (light-dark) cycle, 22°C ± 2°C and 50% ± 10% relative humidity at the animal house of the Complutense University. Sixteen male rats were fed ad libitum with a standard rodent diet (Panlab, Spain) and were divided into two groups of 8 animals each: CONTROL and ATENOLOL. The animals in the atenolol group had free access to a 1 g/L atenolol solution (Sigma, A7655) in the drinking water. Previous studies have used that dose of atenolol to cause blockade of β-adrenergic receptors in rats (30). The control group had free access to the same aliquot of drinking water without atenolol. The mean water intake per animal per day was not significantly different between both groups. After 2 weeks of treatment, the animals were sacrificed by decapitation. Hearts were immediately processed to isolate functional mitochondria, which were used to measure mitochondrial respiration and rates ROS generation rates. The remaining mitochondria were stored at -80°C for posterior analyses. These experiments in Wistar rats were approved by the Animal Experimental Committee from the Complutense University. The present investigation conforms to the Directive 2010/63/EU of the European Parlament.

Isolation of functional mitochondria, oxygen consumption and ROS production

Mitochondria were obtained from fresh tissue by the procedure of Mela and Seitz (31) with modifications. After checking the functionality and phosphorylation capacity of the mitochondria (high respiratory control ratios) the rate of mtROSp was measured by the fluorometric method established at our laboratory (32). The oxygen consumption rate of heart mitochondria was measured at 37°C in a water-thermostatized incubation chamber with a computer-controlled Clark-type O2 electrode (Oxygraph, Hansatech, UK).

Oxidative damage to mtDNA (8-oxodG)

Isolation of mtDNA was performed by the method of Latorre and cols (33) adapted to mammals (34). The isolated mitochondrial DNA was digested to deoxynucleoside level and the level of oxidative damage in mtDNA was estimated by measuring the amount of 8-oxo-7,8-dihydro-2'deoxyguanosine (8-oxodG) referred to that of the non-oxidized base (deoxyguanosine, dG) by HPLC-EC as previously described (35).

Measurement of mitochondrial complexes I, II, III and IV, AIF, MnSOD, SIRT3 and SIRT5

The amounts of a) the mitochondrial respiratory chain complexes (I to IV), the complex I regulatory factor AIF, the mitochondrial biogenesis protein

indicators SIRT3 and SIRT5 and MnSOD were estimated using western blot analyses as previously described (36).

Oxidation-derived protein damage markers

GSA, AASA, CML, CEL and MDAL were determined as trifluoroacetic acid methyl esters (TFAME) derivatives in acid hydrolyzed delipidated and reduced mitochondrial protein samples by GC/MS (32) using a HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain) with a MSD5973A Series detector and a 7683 Series automatic injector, a HP-5MS column (30-m x 0.25-mm x 0.25- μ m), and the described temperature program (32). The amounts of product were expressed as μ moles of GSA, AASA, CML, CEL or MDAL per mol of lysine.

Fatty acid analyses and global fatty acid unsaturation indexes

Fatty acids from mitochondrial lipids were analyzed as methyl esters derivatives by gas chromatography (GC) as previously described (33). The following fatty acyl indices were also calculated: saturated fatty acids (SFA); unsaturated fatty acids (UFA); monounsaturated fatty acids (MUFA); polyunsaturated fatty acids (PUFA) from n-3 and n-6 series (PUFAn-3 and PUFAn-6); and average chain length (ACL)=((Σ Total₁₄ x 14) + (Σ Total₁₆×16) + (Σ Total₁₈×18) + (Σ Total₂₀×20) + (Σ Total₂₂×22) + (Σ Total₂₄×24))/100. The density of double bonds in the membrane was calculated by the Double Bond Index, DBI = (($1\times\Sigma$ mol% monoenoic) + ($2\times\Sigma$ mol% dienoic) + ($3\times\Sigma$ mol% trienoic) + ($4\times\Sigma$ mol% tetraenoic) + ($5\times\Sigma$ mol% pentaenoic) + ($6\times\Sigma$ mol% hexaenoic)). Finally, the membrane susceptibility to peroxidation was calculated by the Peroxidizability Index, PI= (($0.025\times\Sigma$ mol% monoenoic) + ($1\times\Sigma$ mol% dienoic) + ($2\times\Sigma$ mol% trienoic) + ($4\times\Sigma$ mol% tetraenoic) + ($6\times\Sigma$ mol% pentaenoic) + ($8\times\Sigma$ mol% hexaenoic)).

Statistics

Data were analyzed by Student-t tests. The minimum level of statistical significance was set at P < 0.05 in all the analyses.

3. RESULTS

The mean body weight of the animals did not show significant differences between the two experimental groups at the beginning of the experiment (172 ± 2.45 g in the control and 175 ± 2.67 g in the atenolol group). No significant differences in body weight were observed after two weeks of treatment with atenolol either (299 ± 4.09 g in the control and 301 ± 4.75 g in the atenolol group). No significant differences in heart weight and food or water intake were found between the atenolol and the control groups (data not shown).

The rate of oxygen consumption from heart mitochondria was measured in the absence (state 4) and in the presence (state 3) of $500\mu M$ ADP, with complex I-

linked (glutamate/malate) and complex II-linked (succinate + rotenone) substrates (Table 1). No significant differences were detected with both substrates in the state 4 and 3 between atenolol and control groups. However, the rate of oxygen consumption was higher in the phosphorylating state than in the resting state with all the substrates used, indicating the good functionality and tight coupling of the mitochondria.

Table 1.- Rates of oxygen consumption of heart mitochondria from control or atenolol treated Wistar rats.

	CONTROL	ATENOLOL
Glutamate/malate (State 4)	60.8 ± 8.3	60.0±4.8
Glutamate/malate (State 3)	203.1±30.4	189.2±11.8
Glutamate/malate (RCI)	3.5±0.5	3.2±0.3
Succinate+rotenone (State 4)	135.9±9.4	135.1±11.3
Succinate+rotenone (State3)	357.3±22.7	364.2±31.9
Succinate+rotenone (RCI)	2.7±0.1	2.7±0.1

Values are means \pm SEM (nmoles of O_2 / min \cdot mg protein) from 6-8 different samples per group. State 4: oxygen consumption in the absence of ADP. State 3: oxygen consumption in the presence of 500μ M ADP. RCI: Respiratory control index.

The mitochondrial ROS (mitROS) generation rate showed a non-significant trend to decrease in the atenolol group with complex I-linked substrates (glutamate/malate) but not with succinate+rotenone (Table 2). Maximum rates of ROS generation were assayed in the presence of pyruvate/malate+rotenone (maximum complex I ROS production) and succinate+rotenone+antimycin A (maximum complex III ROS production). No significant differences between groups were found either for maximum complex I or complex III generation rates.

Table 2.- Basal and maximum rates of ROS production of heart mitochondria from control or atenolol treated Wistar rats in the presence of different substrates and inhibitors of the mitochondrial respiratory chain.

	CONTROL	ATENOLOL
Glutamate/malate	0.125±0.02	0.076±0.02
Succinate	1.08±0.24	1.37±0.40
Succinate+rotenone	1.34±0.25	1.43±0.26
Glutamate/malate+rotenone	2.67±0.47	2.98±0.51
Succinate+rotenone+Antimycin A	7.04±0.85	6.96±0.83

Values are means \pm SEM (nmoles of H_2O_2 / min mg protein) from 6-8 different samples per group. Values with glutamate/malate+rotenone or succinate+rotenone+antimycin A estimate maximum mitochondrial ROS production from complex I and III respectively. The rest of the values represent basal rates of ROS generation at complex I (with glutamate/malate in forward and with succinate in reverse electron flow) or at complex III (with succinate, and with succinate+rotenone).

The free radical leak (FRL; the percentage of total electron flow in the respiratory chain directed to ROS generation) values of heart mitochondria did not show significant differences between the control and the atenolol group either with pyruvate/malate or succinate+rotenone as substrates (Table 3). Oxidative damage to mtDNA was estimated by measuring the amount of 8-oxodG referred to the amount of the non-oxidized deoxynucleoside (dG) (Table 3). In agreement with the lack of changes in FRL% and mitROS production, we did not observe significant differences in 8-oxodG between the control and the atenolol group.

Table 3.- Free radical leak (FRL%) at the mitochondrial respiratory chain and oxidative damage to mitochondrial DNA of heart mitochondria from control or atenolol treated Wistar rats.

	CONTROL	ATENOLOL
FRL % (glutamate/malate)	0.11±0.03	0.06±0.01
FRL % (succinate+rotenone)	0.56±0.13	0.58±0.10
8-oxodG in mtDNA	6.46±1.07	8.65±1.25

Values are means \pm SEM (nmoles of H_2O_2 / min·mg protein) from 6-8 different samples per group. The FRL% is the percentage of the total electron flow in the respiratory chain directed to oxygen radical generation (see Materials and Methods for further details). It represents the efficiency of the mitochondria avoiding the univalent lateral leak of electrons out of the respiratory chain that generates ROS. The lower the FRL%, the higher such efficiency. 8-oxodG is a marker of steady-state oxidative damage to mtDNA and is expressed as 8-oxodG/ 10^5 dG.

The amounts of the two complex I subunits (NDUFS3 and NDUFA9), complex II, III and IV were measured, as well as AIF (apoptosis inducing factor), SOD2 (superoxide dismutase), SIRT3 and SIRT5 (Figure 1). The NDUFA9 complex I subunit and MnSOD were significantly lower in the atenolol group. The other parameters did not show significant differences between experimental groups.

The markers of protein glycoxidation CEL and CML were significantly higher in the atenolol group (Figure 2). On the other hand, the lipoxidation-dependent marker of protein modification MDAL was significantly lower in atenolol treated animals, and the specific protein carbonyls GSA and AASA did not show significant differences (Figure 2).

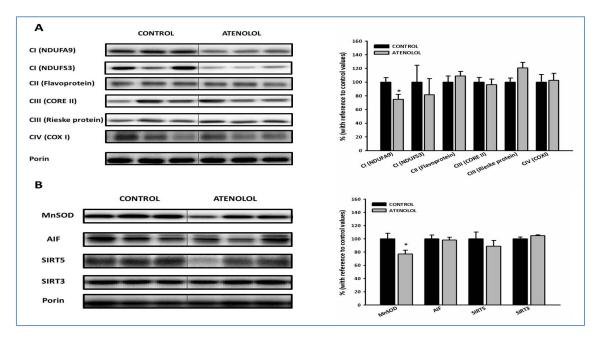


Figure 1.- Mitochondrial ETC complexes, MnSOD, AIF, SIRT3 and SIRT5 from control and atenolol treated Wistar rats. A, left: Representative immunoblots showing relative levels of mitochondrial complex subunits from complex I to IV of heart mitochondria from control and atenolol treated Wistar rats; right: The relative values were obtained by densitometric analyses. The intensity of each product was related to the control protein porin. B, left: Representative immunoblots showing relative levels of regulatory factors of mitochondrial biology of heart mitochondria from control and atenolol treated wistar rats; right: The relative values were obtained by densitometric analyses. The intensity of each product was related to the control protein porin. Values are means ± SEM from 6-7 different samples per group. Asterisks represent significant differences compared to the control group: *P<0.05.

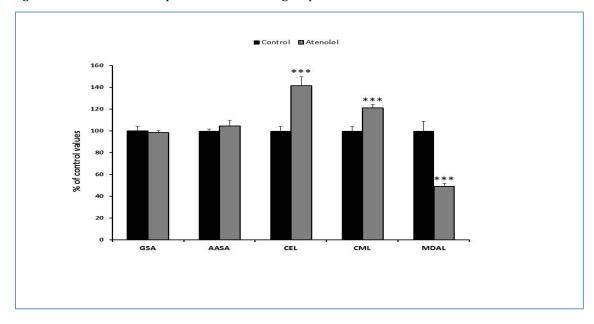


Figure 2.- Protein oxidation, glycoxidation and lipoxidation markers of heart mitochondria from control and atenolol treated Wistar rats. Values are means \pm SEM from 8 different samples and are expressed as percentage from control group. Control values: 5276.91 \pm 238.38 (Glutamic SemiAldehyde, GSA); 229.67 \pm 4.31 (AASA, AminoAdipic SemiAldehyde, AASA); 605.79 \pm 23.36 (CarboxyEthyl-Lysine, CEL); 1558.30 \pm 62.06 (CarboxyMethyl-Lysine, CML); 584.47 \pm 51.77 (MalonDiAldehyde-Lysine, MDAL). Units: μ mol/mol lysine. Asterisks represent significant differences between control and atenolol rats: *** P<0.001.

The fatty acid composition of heart mitochondria lipids and derived indexes were also measured (Table 4). The fatty acids 18:0, 20:4n-6, 22:0, 22:4n-6, 22:5n-6, 22:5n-3, 22:6n-3 and 24:0 were significantly lower and the fatty acid 18:2n-6 was significantly higher in the atenolol group. Due to these changes the acyl chain length decreased (ACL; 0.66% total decrease), the PUFAn-3 strongly decreased (27.61% total decrease) and the PUFAn-6 increased (12.31 % total increase). The final result was a strong decrease in the peroxidizability index (PI; 15.20% total decrease) and a non-significant trend to decrease the total number of double bonds (6.94% total decrease in the double bond index, DBI) in the atenolol group in relation to the control group (P<0.01 in PI; Figure 3).

The estimation of the desaturase and elongase activities is shown in Tables 5 and 6. The desaturase activity $\Delta 9$ (n-9) was higher, while $\Delta 5$ (n-6) was lower in the atenolol group. Integrated n-6 and n-3 desaturation and elongation activities were also lower in the atenolol group. The elongase activities ELOVL 1/3, ELOVL 5 (n-6), ELOVL 2/5 (n-6) and ELOVL 2/5 (n-3) were significantly lower in the atenolol group.

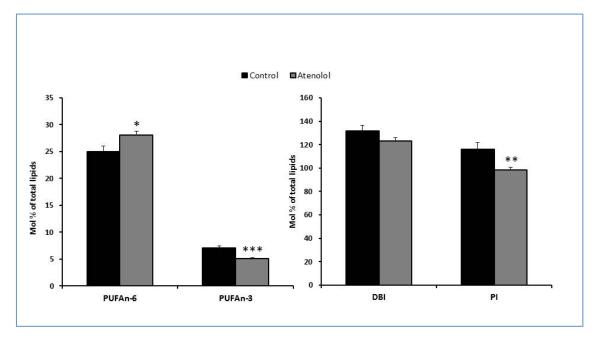


Figure 3.- PI and DBI (fatty acid unsaturation degree) and total PUFAn-6 and PUFAn-3 of heart mitochondria from control and atenolol treated Wistar rats. PUFA= polyunsaturated fatty acid; DBI=double bond index; PI= Peroxidizability index. Abbreviations and calculations of fatty acid classes and indexes are explained in the Materials and Methods section. Control values: 116.22 ± 5.49 (PI); 131.93 ± 4.70 (DBI); and 7.10 ± 0.39 (for PUFAn-3) and 25.01 ± 0.97 (for PUFAn-6), both expressed as mol %. Values are means \pm SEM from 8 different samples per group. Asterisks represent significant differences compared to the control group: \pm P<0.05; \pm P<0.01; \pm P<0.001.

Table 4.- Fatty acyl composition (mol %) of total lipids of the heart mitochondria from control and atenolol treated Wistar rats.

	CONTROL	ATENOLOL
14:0	1.29±0.05	1.23±0.05
16:0	24.77±0.77	24.61±0.70
16:1n-7	1.14±0.05	1.18±0.04
18:0	25.45±0.22	24.28±0.22**
18:1n-9	14.29±0.31	14.65±0.24
18:2n-6	10.89±0.55	15.51±0.65***
18:3n-3	0.39±0.01	0.41±0.03
18:4n-3	0.13±0.01	0.13±0.01
20:0	0.18±0.01	0.18±0.01
20:1n-9	0.28±0.05	0.23±0.03
20:2n-6	0.93±0.03	1.01±0.03
20:3n-6	0.76±0.02	0.84 ± 0.03
20:4n-6	11.61±0.48	10.16±0.26*
20:5n-3	0.14±0.01	0.15±0.01
22:0	0.24 ± 0.02	0.19±0.01**
22:4n-6	0.34 ± 0.03	0.23±0.02**
22:5n-6	0.35±0.03	0.20±0.01***
22:5n-3	1.04±0.05	0.88±0.04*
22:6n-3	5.52±0.43	3.69±0.15***
24:0	0.24 ± 0.01	0.20±0.01**
ACL	18.02±0.04	17.90±0.02*
SFA	52.17±0.97	50.69±0.89
UFA	47.82±0.97	49.30±0.89
MUFA	15.71±0.37	16.06±0.29
PUFA	32.11±1.24	33.24±0.76

Values are means \pm SEM from 8 different samples. ACL, acyl chain length, SFA, saturated fatty acids, UFA unsaturated fatty acids, MUFA, monounsaturated fatty acids, PUFA polyunsaturated fatty acids. Asterisks represent significant differences between the control and the atenolol group. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Table 5.- Estimation of desaturase activities of heart mitochondria from control or atenolol treated Wistar rats.

DESATURASES		Control	Atenolol
Δ9 (n-7)	C16:1/C16:0	0.046±0.001	0.048±0.002
Δ9 (n-9)	C18:1/C18:0	0.561±0.010	0.604±0.013*
Δ8 (n-6)	C20:3/C20:2	0.828±0.044	0.846±0.025
Δ5 (n-6)	C20:4/C20:3	15.387±0.795	12.123±0.493**
n-6*	C22:5/C18:2	0.099±0.009	0.058±0.004**
n-3*	C22:6/C18:3	14.289±1.494	9.141±0.566**

^{*} Integrated desaturase/elongase activities for the n-6 and n-3 series.

Table 6.- Estimation of elongase activities of heart mitochondria from control or atenolol treated Wistar rats.

ELONGASES		Control	Atenolol
ELOVL 3 (n-9)	C20:1/C18:1	0.019±0.003	0.015±0.001
ELOVL 6	C18:0/C16:0	1.033±0.029	0.991±0.023
ELOVL 1/3	C20:0/C18:0	0.007±0.001	0.007±0.001
ELOVL 1/3	C22:0/C20:0	1.371±0.048	1.018±0.051***
ELOVL 1/3	C24:0/C22:0	1.392±0.096	1.077±0.036**
ELOVL 5 (n-6)	C20:2/C18:2	0.086±0.004	0.065±0.003**
ELOVL 2/5 (n-6)	C22:4/C20:4	0.028±0.001	0.023±0.001*
ELOVL 2/5 (n-3)	C22:5/C20:5	7.508±0.418	6.071±0.443*

4. DISCUSSION

In the present investigation the effect of the selective β -1 blocker atenolol on oxidative stress related parameters was studied in the Wistar rat heart for the first time. This drug, which has been used in humans for decades without known important side effects, and with beneficial effects like reduced mortality and morbidity reported in many clinical studies (37), decreased the fatty acid unsaturation degree, protein lipoxidation levels and desaturase activities after two weeks of treatment. The reported decrease in fatty acid unsaturation and oxidative stress after interruption of β -adrenergic receptor signalling induced by atenolol could be one of the mechanisms, among other, responsible for the longevity increase observed in 129/SvJ-C57BL/6 AC5KO mice (1). Atenolol decreased the heart fatty acid unsaturation degree of atenolol-treated C57BL/6 mice, reducing DBI, PI and total PUFA. Atenolol treatment was able to lower protein oxidation and lipoxidation and to increase p-ERK levels in those mice too (38). In the present investigation we wanted to clarify if atenolol has the same effects in genetically

heterogeneous animals like the Wistar rat, and to ascertain whether β -adrenergic blockade, which increases longevity (1), decreases oxidative stress.

Atenolol treatment did not modify body weight, heart weight or animal food intake discarding the possibility that the observed changes could be secondary effects of caloric restriction. In our study, atenolol treatment did not change either complex I or III mitROS generation rate, with their specific substrates glutamate/malate and pyruvate/malate and the inhibitors rotenone and antimicyn A. These results agree with previous studies (38), and are in contrast to dietary, protein and methionine restriction models in which mitROS generation decreases at complex I (10). Many studies from different laboratories have shown that dietary restriction lowers mitROS generation (39). After testing restriction of different diet components, we concluded that only protein restriction decreased mitROS production (8) and methionine was the aminoacid responsible for it (9). Dietary, protein and methionine restriction also increased maximum longevity. Thus β -adrenergic blockade does not seem to follow the same pattern as these three types of restriction and probably the increase in longevity observed in AC5 KO mice would not be related to a reduced mitROS generation rate. In relation to the lack of effect of atenolol treatment on mitROS generation, the level of 8-oxodG in mtDNA (which indicates the balance between mtDNA oxidative damage and repair) did not change in the heart of atenolol treated rats. Both parameters, mitROS generation and 8-oxodG levels in mtDNA, change together and in similar direction in different models of dietary restriction studied and both are lower in long-lived compared to short-lived animal species (40).

Since atenolol did not modify mitROS generation or mtDNA oxidative damage, we focused on the other oxidative stress longevity-related parameter: the fatty acid unsaturation degree. Membrane phospholipids are susceptible to oxidative alterations due to physico-chemical properties of the membrane bilayer, in which oxygen and free radicals are more soluble than in the aqueous medium. For this reason membrane lipids are highly sensitive to oxidative damage. On the other hand, PUFA residues of phospholipids are extremely sensitive to oxidation, and this sensitivity increases exponentially as a function of the number of double bonds per fatty acid molecule (15). It has been observed in many different animal species (5) that the total number of double bonds (DBI) and the peroxidizability index (PI) from membrane fatty acids are lower in long-lived than in short-lived animals. A low membrane fatty acid unsaturation degree is also present in extraordinarily long-lived animals like birds (41,42), naked mole-rats (43), echidna (44) and queen honeybees (45). This also occurs in long-lived wildderived strains of mice compared to genetically heterogeneous laboratory mice (46). In our study, atenolol treatment significantly decreased the PI (15.20% total decrease) and tended to decrease the DBI (6.49% total decrease) in the rat heart.

It is known that the low DBI observed in long-lived species is due to changes in the type of unsaturated fatty acids in the membrane composition. There is a systematic redistribution between the type of PUFAs present from the highly unsaturated docosahexaenoic (22:6n-3) and sometimes arachidonic (20:4n-6) acids in short-lived species to the less unsaturated linoleic acid (18:2n-6) and, in some cases, linolenic acid (18:3n-3) in the long-lived ones at mitochondrial and tissue levels (16). Among these, the fatty acid contributing most to decrease the global fatty acid unsaturation degree in long-lived animals is 22:6n-3. With the purpose of checking if similar changes occur in our model, we measured the full fatty acid composition of heart mitochondria membranes. We found that atenolol treatment in the Wistar rat heart leads to variations in several fatty acids, but among them, the most important, quantitatively, was the decrease in the highly unsaturated 22:6n-3, which was responsible to a great extent for the decrease in the PI. This fatty acid is present in tissue cellular membranes at lower levels in long-lived than in short-lived animals, including the long-lived naked mole-rats (47) and it also decreases after atenolol treatment in C57BL/6 mice (38). In the present study, moreover, we found other atenolol-induced decreases in fatty acids which were involved in the decrease of fatty acid unsaturation (lower PI): decreases in 20:4n-6, 22:4n-6, 22:5n-6, 22:5n-3 and 22:6n-3, whereas 18:2n-6 increased. It is also interesting that in the senescence-accelerated mouse (SAM) strain, the SAM-prone mice had greater levels of the highly polyunsaturated peroxidation-prone fatty acids 22:6 n-3 and 20:4n-6 and lower levels of the less peroxidation-prone 18:2n-6 PUFA in their membranes, and consequently they had a greater PI than the SAM-resistant mice (48,49). SAM-prone mice also showed greater degree of lipid peroxides in their tissues than SAM-resistant mice (50).

What are the consequences of this decrease in PI? A low PI (sensitivity to peroxidation) and DBI (double bound index) confer higher resistance of membranes to lipid peroxidation and lower lipoxidation-dependent damage to macromolecules. Previous studies have shown that the heart of long-lived animals has lower levels of MDAL, a specific marker of lipoxidation-dependent damage to proteins, compared to short-lived species (26). In the present study the fatty acid unsaturation decrease (lower PI) after atenolol treatment correlated with a remarkable decrease in MDAL (49% lower in the atenolol group). Lipid peroxidation generates products like MDAL or hydroxynonenal, but it also produces secondary free radicals. The decreased fatty acid unsaturation degree in the atenolol group could thus be responsible for a lower lipid-derived secondary free radical formation, decreased specific lipoxidation markers like MDAL and damage to other macromolecules (51).

On the other hand, there were no changes in the protein oxidation markers measured (GSA and AASA), but in contrast, protein glycoxidation, quantified as the

level of CEL and CML, was increased in the heart after atenolol treatment. These results are in agreement with previous experiments in mice where increases in CEL and CML were also observed (38). Several studies have reported dissociation between markers of lipoxidation and those of glycoxidation or pure oxidation. Thus, increasing fatty acid unsaturation in the rat heart by dietary manipulation strongly elevated MDAL, whereas CML (which can be formed by lipoxidation and glycoxidation) was only slightly elevated (52). On the other hand, MDAL negatively correlated with longevity in the heart of mammals (26), but no correlation between longevity and heart CML or CEL levels was observed in the same investigation. Our results do not clarify why CML and CEL were increased. The formation of those protein adducts could involve chemical reaction with oxidized fragments coming from carbohydrates like glucose, but they may also be formed at a high rate from glycolytic intermediates (40). It is possible that the atenolol treatment increased the concentration of glycolytic intermediates, and that could explain why the glycoxidation markers were increased in our experiment.

Polyunsaturated fatty acids are generally synthesized by modification of saturated fatty acid precursors that are products of fatty acid synthase. This process is catalized by two kind of specific enzymes: desaturases and elongases. The enzymatic steps of microsomal fatty acid elongation involve the addition of two-carbon units to a fatty acyl-CoA employing malonyl-CoA as the donor and NADPH as the reducing agent. To date, seven ELOVL proteins (elongase enzymes referred to as Elongation of very-long-chain fatty acids) have been identified, with ELOVL1, 3, 6 and 7 preferring saturated and monounsaturated fatty acids as substrate and ELOVL2, 4 and 5 being selective for polyunsaturated fatty acids (PUFAs). All ELOVL proteins contain several stretches of amino acids that are fully conserved in mice, rats and humans (53). The desaturase enzymes, which are also highly conserved, insert double bonds at specific carbon atoms (the Δ number indicates the position at which the double bond is introduced) in the fatty acid chain and the fatty acid elongation system elongates the precursors in two-carbon increments (54). The fatty acid desaturation pathway and the deacylationreacylation cycle are the main mechanisms responsible for the fatty acid composition of cell membranes.

In the present investigation we estimated the desaturase and elongase activities. The $\Delta 5$ (n-6) activity was lower in the atenolol group , as it has also been reported in long-lived species, which show several fold lower $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturase activities than short-lived ones (16,55). This can explain why 22:6n-3 and 20:4n-6 decrease, and 18:2n-6 and 18:3n-3 increase from short to long-lived animals, since desaturases are the rate-limiting enzymes of the n-3 and n-6 pathways synthesizing the highly unsaturated PUFAs 20:4n-6 and 22:6n-3 from their dietary precursors, 18:2n-6 and 18:3n-3, respectively. In our study the global

n-6 and n-3 desaturases were also significantly lower in the atenolol treated animals. This fact can explain the fatty acid unsaturation decrease in the atenolol group. Desaturation pathways would make available in situ the n-6 and n-3 fatty acids to phospholipid acyltransferases in order to remodel the phospholipid acyl groups. The fact that acyltransferase/n-6 desaturase activity ratio is about 10:1 in tissues (56) reinforces the idea that regulation of desaturases can be the main limiting factor responsible for the observed fatty acid unsaturation-longevity relationship (40), as well as for the fatty acid changes observed in the present study. On the other hand, in this study we found a decrease in the following elongase activities in the atenolol group: ELOVL 1/3, which catalyzes the formation of saturated fatty acids containing as many as 26-carbons; ELOVL 5 (n-6), that catalyzes the initial and rate-limiting desaturation of C18:2n-6 and C18:3n-3 for the production of longer-chain PUFAs; and ELOVL 2/5 (n-6) and (n-3) which are involved in PUFA elongation from C20:3n-6 and C20:4n-3. The lower elongase activities in atenolol treated animals may be responsible for the decrease in the acyl chain length in this group.

An intact respiratory chain is needed to get the maximum capacity available for mitochondrial energy production. Besides, studies in rodents show that the amount of respiratory complexes in the respiratory chain can change in experimental modifications that extend life-span. Therefore, we measured the amounts of the four respiratory complexes in our study. There were no differences in the amount of any of the complexes except in the NDUFA9 complex I subunit, which was lower in the atenolol group. In previous studies of methionine restriction (57) and caloric restriction (58) it has been observed that the amount of complex I was decreased. It is well known that both complex I and complex III produce ROS in isolated mitochondria (23,59). However, the difference in ROS production between species with different longevities and between caloric restricted and ad libitum-fed animals seems to come exclusively from complex I (23). Then, the slight decrease observed in the complex I amount in our study can be responsible for the non-significant trend to decrease mitochondrial ROS production with complex I linked substrates (glutamate/malate), and probably the adaptive response of the MnSOD content. This decrease would not be as remarkable as in the case of caloric or methionine restriction, in which the time of treatment was longer (7 weeks) in contrast to the 15 days of atenolol treatment implemented here.

AIF is a mitochondrial flavoprotein involved in the assembly/manteinance of complex I, and besides its role in apoptosis, it is also required for mitochondrial oxidative phosphorylation (22). Similarly to what was previously reported in atenolol treated mice (38), in the present investigation AIF did not change after atenolol treatment, suggesting that the decrease in apoptosis that was observed in

the long-lived AC5 KO mice was probably AIF independent. On the other hand the atenolol treatment did not modify SIRT3 values, which would agree with the absence of changes in mitROS production rate observed in our study. SIRT3 has been reported to increase the activity of complex I through direct interaction and deacetylation of several of its subunits (27). Finally, the unchanged content observed for SIRT5 also agree with the absence of changes in oxidative metabolism (oxygen consumption) observed in the present work.

In conclusion, the results of the present investigation, together with previous reports in mice (1, 38) suggest that β-adrenergic receptor signaling blockade can be a useful model looking for pharmacologically-induced decreases in oxidative stress and possible increases in lifespan. Atenolol treatment improved parameters related to oxidative stress and longevity such as membrane fatty acid unsaturation degree, the peroxidizability index and protein lipoxidation in a time period as short as fifteen days. It would be very interesting to further investigate the effect of atenolol in different organs (other than the heart), species and times of action, and to clarify the cellular signaling mechanisms by which this β-blocker decreases fatty acid unsaturation. The interruption of the beta-adrenergic receptor signaling pathway in AC5 KO mice resulted in delaying bone and heart aging and increasing mean and maximum longevity. Those beneficial changes seemed to be under the stimulation of the Raf/MEK/ERK signalling pathway. Previous studies also observed that atenolol-treated mice had higher levels of p-ERK (38). That could suggest that the decrease in fatty acid unsaturation and oxidative stress induced by atenolol could be due to changes in gene expression activated by increases in ERK-dependent signalling. Finally, lowering oxidative stress with atenolol can be easier to implement in humans than caloric restriction. Atenolol seems to be a rather well tolerated drug, which has been used for decades in large human populations without, apparently, important side effects.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by I+D grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2008-00335/BFI; BFU2011-23888) to G.B; and grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2009-11879/BFI), and the Generalitat of Catalonia (2009SGR735) to R.P. A. G., I. S-R and J. G. received predoctoral fellowships from the Ministry of Education and Science.

6. REFERENCES

1. Yan, L.; Vatner, D.E.; O'Connor, J.P.; Ivessa, A.; Ge, H.; Chen, W.; Hirotani, S.; Ishikawa, Y.; Sadoshima, J.; Vatner, S.F.. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. Cell **2007**; 130, 247–258.

- 2. Barja, G.; Cadenas, S.; Rojas, C.; Pérez-Campo, R.; López-Torres, M., Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. Free Rad Res **1994**; 21, 317–327
- 3. Barja, G.; Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuv Res* **200**7; *10*, 215–224
- 4. Pamplona, R.; Portero Otín, M.; Riba, D.; Ruiz, C.; Prat, J.; Bellmunt, M.J.; Barja, G. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res* **1998**; *39*, 1989-94
- 5. Hulbert, A.J.; Pamplona, R.; Buffestein, R.; Buttemer, W.A. Life and death: metabolic rate, membrane composition and life span of animals. *Physiological Reviews* **2007**; *87*, 1175-1213
- 6. Hagopian, K.; Chen, Y.; Simmons Domer, K.; Soo Hoo, R.; Bentley, T.; McDonald, R.B.; Ramsey, J.J. Caloric restriction influences hydrogen peroxide generation in mitochondrial sub-populations from mouse liver. *J Bioenerg Biomembr* **2011**; *43*, 227-36
- 7. Gredilla, R.; Barja, G. Caloric restriction, aging and oxidative stress. *Endocrinology* **2005**; *146*, 3713–3717
- 8. Sanz, A.; Caro, P.; Barja, G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* **2004**; *36*, 545–552
- 9. Sanz, A.; Caro, P.; Ayala, V.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Barja, G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J* **2006a**; *20*, 1064–1073
- 10. Pamplona, R.; Barja, G. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* **2011**; *12*, 409:35
- 11. Shmookler Reis, R.J.; Xu, L.; Lee, H.; Chae, M.; Thaden, J.J.; Bharill, P.; Tazearslan, C.; Siegel, C.; Alla, R.; Zimniak, P.; Ayyadevara, S. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of C. elegans mutants. *Aging* **2011**; 3, 125–147
- 12. Hulbert, A.J. Metabolism and longevity: Is there a role for membrane fatty acids? *Integr Comp Biol* **2010**; *50*, 808-17
- 13. Naudi, A.; Jove, M.; Ayala, V.; Portero-Otin, M.; Barja, G.; Pamplona, R. Regulation of membrane unsaturation as antioxidant adaptive mechanism in long-lived animal species. *Free Rad Antiox* **2011**; *1*, 3-12
- 14. Pratt, D.A.; Tallman, K.A.; Porter, N.A. Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks. *Acc Chem Res* **2011**; 44, 458-67
- 15. Holman, R.T. Autoxidation of fats and related substances. In: Holman RT, Lundberg WO, Malkin T (eds) Progress in chemistry of fats and other lipids. *Pergamon Press, London*, **1954**; 51–98
- 16. Pamplona, R.; Barja, G.; Portero-Otín, M. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation. *Ann New York Acad Sci* **2002**; *959*, 475-490
- 17. Liang, H.; Masoro, Nelson, J.F.; Strong, R.; McMahan, C.A.; Richardson, A. Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp Gerontol*, **2003**; *38*, 1353–1364
- 18. Selman, C.; Withers, D.J. Mammalian models of extended healthy lifespan. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2011**; *366*, 99-107
- 19. Narasimhan, S.D.; Yen, K.; Tissenbaum, H.A. Converging pathways in lifespan regulation. *Curr Biol*, **2009**; *19*, 657-6
- 20. Selman, C.; Tullet, J.M.A.; Wieser, D.; Irvine, E.; Lingard, S.J.; Choudhury, A.I.; Claret, M.; Al-Qassab, H.; Carmignac, D.; Ramadani, F.; Woods, A.; Robinson, I.C.A.; Schuster, E.; Batterham, R.L.; Kozma, S.C.; Thomas, G.; Carling, D.; Okkenhaugk, K.; Thornton, J.M.;

- Patridge, L.; Gems, D.; Wither, D.J. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* **2009**; 326, 140–144
- 21. Okumura, S.; Suzuki, S.; Ishikawa, Y. New aspects for the treatment of Cardiac Diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: Effects of targeted disruption of the type 5 adenylyl cyclase gene. *J Pharmacol Sci* **2009**; 109, 354-359
- 22. Porter, A.G.; Urbano, A.G. Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* **2006**; *28*, 834-843
- 23. Barja, G. Free radicals and aging. Trends in Neurosci 2004; 27, 595-600
- 24. Gredilla, R.; Sanz, A.; Lopez-Torres, M.; Barja, G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at Complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* **2001**; *15*, 1589-1591
- 25. Barja G.; Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals, *FASEB J*, **2000**; *14*, 312-318
- 26. Ruiz, M.C.; Ayala, V.; Portero-Otín, M.; Requena, J.R.; Barja, G.; Pamplona, R. Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* **2005**; 126, 1106-1114
- 27. Bell, E.L.; Guarente, L.; The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Mol Cell* **2011**, 42, 561-568.
- 28. Someya, S.; Yu, W.; Hallows, W.C.; Xu, J.; Vann, J.M.; Leeuwenburgh, C.; Tanokura, M.; Denu, J.M.; Prolla, T.A. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of agerelated hearing loss under caloric restriction. *Cell* 2010, 143, 802-812
- 29. Schlicker, C.; Gertz, M.; Papatheodorou, P.; Kachholz, B.; Becker, C.F.; Steegborn, C. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* **2008**; 382, 790-801.
- 30. Shimada, K.; Nishikimi, T.; Kawarabayashi, T.; Takeuchi, K.; Takeda, T. Effect of prolonged beta-adrenergic blockade induced by atenolol on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in the rat. *Ipn Heart J* **1995**; 36, 81-9
- 31. Mela, L.; Seitz, S. Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol* **1997**; *55*, 39-46
- 32. Barja, G. The quantitative measurement of H2O2 generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **2002**; 34, 227-233
- 33. Latorre, A.; Moya, A.; Ayala, A. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila suboscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**; *83*, 8649-8653
- 34. Asuncion, J.C.; Millan, A.; Pla, R.; Bruseghini, L.; Esteras, A., Pallardo, F.V.; Sastre, J.; Viña, J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* **1996**; *10*, 333-338
- 35. Loft, S.; Poulsen, H.E. Markers of oxidative damage to DNA: Antioxidants and molecular damage. *Methods Enzymol* **1999**; 300, 166-184
- 36. Pamplona, R.; Portero-Otin, M.; Ruiz, C.; Gredilla, R.; Herrero, A.; Barja G. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* **1999**; 112, 169–183
- 37. Rehsia, N.S.; Dhalla N.S. Mechanism of the beneficial effects of beta-adrenoceptor antagonists in congestive heart failure. *Exp Clin Cardiol* **2010**; 15, 86-95
- 38. Sanchez-Roman, I.; Gomez, J.; Naudi, A.; Ayala, V.; Portero-Otín, M.; Lopez-Torres, M.; Pamplona, R.; Barja, G. The beta-blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rejuv Res* **2010**; *13*, 683–693

- 39. López-Torres, M.; Barja, G. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction. Possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* **2008**; 1780, 1337-1347
- 40. Pamplona, R.; Barja, G. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* **2007**; 6, 189–210
- 41. Pamplona, R.; Portero-Otín, M.; Requena, J.R.; Thorpe, S.R.; Herrero, A.; Barja, G. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev* **1999**; 106, 283-296
- 42. Buttemer, W.A.; Battam, H.; Hulbert, A.J. Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *Biol Lett* **2008**; 4, 351-354
- 43. Mitchell, T.W.; Buffenstein, R.; Hulbert, A.J. Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (Heterocephalus glaber): A comparative study using shotgun lipidomics. *Exp Gerontol* **2007**; 42, 1053-1062
- 44. Hulbert, A.J.; Beard, L.A.; Grigg, G.C. The exceptional longevity of an egg-laying mammal, the short-beaked echidna (Tachyglossus aculeatus) is associated with peroxidation-resistant membrane composition. *Exp Gerontol* **2008**; 43, 729-733
- 45. Haddad, L.S.; Kelbert, L.; Hulbert, A.J. Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistamt membranes. *Exp Gerontol* **2007**; 42, 601-609
- 46. Hulbert, A.J.; Faulks, S.C.; Harper, J.M.; Miller, R.A.; Buffenstein, R. Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mech Ageing Dev* **2006**; 127, 653-657
- 47. Buffenstein, R. The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research? *J Gerontol* **2005**; 60, 1369–1377
- 48. Choi, J.H.; Kim, J.I.; Kim, D.W.; Moon, Y.S.; Chung, H.Y.; Yu, B.P. Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age* **1996**; 19, 1–5
- 49. Park, J.W.; Choi, C.H.; Kim, M.S.; Chung, M.H. Oxidative status in senescence-accelerated mice. *J Gerontol* **1996**; 51, B337–B345
- 50. Matsugo, S.; Kitagawa, T.; Minami, S.; Esashi, Y.; Oomura, Y.; Tokumaru, S.; Kojo, S.; Matsushima, K.; Sasaki, K. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett* **2000**; 278, 105–108
- 51. Spiteller, G. Is lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? *Rejuv Res* **2010**; 13, 91-103
- 52. Herrero, A.; Portero-Otín, M.; Bellmunt, M.J.; Pamplona, R.; Barja, G. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H2O2 production and lipid and protein oxidative damage. *Mech Ageing Dev* **2001**; 122, 427-443
- 53. Guillou, H.; Zadravec, D.; Martin, P.G.; Jacobsson, A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* **2010**; 49, 186-99
- 54. Nakamura, M.T.; Nara, T.Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr* **2004**; 24, 345-76
- 55. Hulbert, A.J.; Rana, T.; Couture, P. The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. *Comput Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2002**; 132, 515–527

- 56. Ivanetich, K.M.; Bradshaw, J.J.; Ziman, M.R. Delta 6-desaturase: improved methodology and analysis of the kinetics in a multi-enzyme system. *Biochim Biophys Acta* **1996**; 1292, 120-132
- 57. Caro, P.; Gómez, J.; López-Torres, M.; Sánchez, I.; Naudí, A.; Jove, M.; Pamplona, R.; Barja, G. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* **2008**; *9*, 183–196
- 58. Desai, V.G.; Weindruch, R.; Hart, R.W.; Feuers, R.J. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys* **1996**; 333, 145-15
- 59. Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, A.O.M. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* **1976**; 156, 435-444

ARTÍCULO

Microalgae: the first nuclear engineers?

Beatriz Baselga-Cervera, Victoria López-Rodas, Camino García-Balboa, Eduardo Costas*

Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Complutense University, Madrid 28040, Spain. *e-mail: ecostas@ucm.es

Recibido el 9 de Julio de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 4(2013), pag. 634-645

ABSTRACT

Self-sustaining nuclear chain reactions ran spontaneously 1.7 billion years ago at Oklo (Gabon, Africa) are a mystery. It was hypothesized that the microalgae concentrated enough rich-uranium in Oklo as for a natural reactor to start operating. The key to understanding as microalgae could do this is in an extremely U-contaminated pond of Saelices uranium-mine (Spain). Some microalgae colonized this extreme pond due to spontaneous mutations of single-genes. These U-resistant microalgae concentrate 115 mg U/g dried-biomass by bio-adsorption and bioaccumulation and are able to enrich uranium producing isotopic fractionation 235 U/ 238 U. Consequently, microalgae could be able to build a nuclear reactor in appropriate circumstances.

Keywords: Microalgae; Uranium; Nuclear reactors.

RESUMEN

Microalgas: ¿los primeros ingenieros nucleares?

Las reacciones nucleares en cadena auto-sostenibles que ocurrieron espontáneamente hace 1.700 millones años en Oklo (Gabón, África) son un misterio. Hipotéticamente las microalgas concentraron suficiente uranio enriquecido para que un reactor nuclear natural comenzara a operar. La clave está en un estanque contaminado por uranio en la mina de Saelices (España). Algunas microalgas colonizaron este estanque extremo debido a mutaciones espontáneas de genes individuales. Estas microalgas Uranio-resistentes concentran 115 mg U / g de biomasa seca mediante bio-absorción y bioacumulación, siendo capaces de enriquecer uranio produciendo fraccionamiento isotópico ²³⁵U/²³⁸U. Estas microalgas podrían construir un reactor nuclear en circunstancias apropiadas.

Palabras clave: Microalgas; Biorremediación de uranio; Reactor nuclear.

1. INTRODUCTION

When on 2nd December of 1942 Enrico Fermi started the nuclear reactor Chicago Pile-1 (CP-1) as part of the Manhattan Project at the Metallurgical Laboratory of the Chicago University, he was convinced that CP-1 was the first nuclear fission reactor running on Earth, he was far removed from reality. 1.7 billion years ago, at Oklo in Gabon, Africa, 16 natural nuclear fission reactors (i.e. a uranium-rich deposit where self-sustaining nuclear chain reactions have occurred) took place and ran approximately for hundred thousand years (1-2). Oklo was discovered in 1972 by the French physicist Francis Perrin while he was analysing isotope ratios, a possibility previously predicted by Kuroda (3).

A nuclear chain reaction took place in a uranium-rich deposit inundated with water (that acted as a neutron moderator) at Oklo originating a natural nuclear reactor (1, 4-5). The key factor for this event to happen was that the fissile isotope 235 U reaches around 3.1% of the total uranium amount, a similar amount as the used in some of human manufactured reactors.

Lovelock (6) proposed that the microalgae could have concentrated ²³⁵U in Oklo. But to date no experimental evidences were provided in this regard.

For become able to build a natural nuclear reactor microalgae need to meet three characteristics:

- i) being able to survive in an environment contaminated by uranium,
- ii) being able to concentrate uranium,
- iii) being able to produce isotopic fractionation enriching the relationship $^{235}\rm{U}/^{238}\rm{U}.$

It seems unlikely that these three characteristics take place simultaneously in microalgae. First, surviving under uranium contamination environment is not straightforward. Uranium is a hazardous element owing to its toxicity as heavy metal as well as its radioactivity (7). Second, neither seems simple that microalgae bio-accumulate uranium because it is a material that has no biological utility. But the hardest challenge to meet is that microalgae could get isotopic fractionation of uranium.

How microalgae could acquire these 3 qualities?

Astonishingly, there are experimental evidences that some microalgae species were able to do this in a pond extremely contaminated by uranium at the Saelices U-mine (Salamanca province, Spain). And they have recently started: since the sixties of past century.

In this paper we review these surprising evidences.

2. AN EXTREME ENVIRONMENT: THE URANIUM-POLLUTED POND AT SAELICES MINE.

Huge uranium deposits occur in the fracture areas in shale and schist of the pre-Ordovician schist-greywacke complex that forms part of the paleozoic basement of the Hesperian Massif in Iberian Peninsula (8). As anecdotic historian, the uranium mining of the Hesperian Massif was an important radio supply source for the experiments conducted by Madame Curie. The most important of these uranium deposits with a total volume of 25 million cubic meters, and an ore grade ranging from 400 to 800 mg kg⁻¹ of uranium are in Saelices, Salamanca (Spain) which were exploited in mining since 1960 until 2000. As a result of these mining activities of static and dynamic acid lixiviation there are around 30 ha of uranium-polluted ponds containing 1 million m³ of uranium-polluted water (Figure 1).

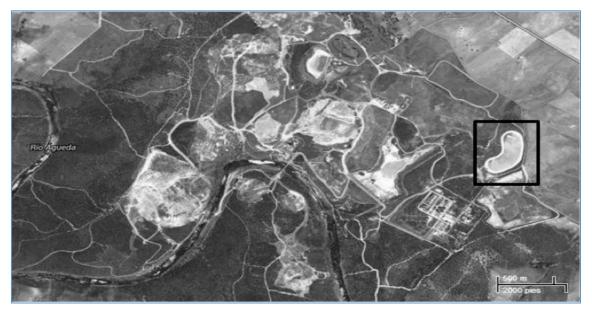


Figure 1.- Air image of Saelices mine sampled area, located in the Saelices el Chico municipality, in Salamanca, Spain. The square indicates the mining evaporation pond from where the water samples were taken.

We studied a huge evaporation pond at the Saelices mining area from March 2012. This pond is an extreme ecosystem with uranium contamination, pollution by other heavy metals, acidity and radioactivity as shows in Table 1. Median value of uranium concentration obtained during a yearly cycle exceeds 833 times the uranium levels in water considered safe by the EPA. We also studied a natural pond at Zamarra, without mining activity that can serve as a baseline of pollution levels in that area before human activity (Table 1).

Table 1.- Environmental conditions and microalgae diversity in the evaporation pond at the Saelices mining area versus a natural pond (Zamarra pond) in a near area but without mining activity.

	Saelices evaporation	Zamarra pond
Uranium concentration (mg L ⁻¹)	25.0	b.d.1
Pb (μg L ⁻¹)	5.6	<0.1
рН	3.4	6.9
Conductivity (mS cm-1)	10.8	0.2
Radioactivity (μSv h ⁻¹)	4	<0.1
Number of microalga species	4	>25

(b.d.l. = below detection limit).

3. MICROALGAE ARE ABLE TO SURVIVE IN AN ENVIRONMENT CONTAMINATED BY URANIUM

Microalgae are very successful organisms, dominating a large number of habitats including extreme environments. Its biological characteristics (i.e. haploids, short generation times, enormous population size) allow them to adapt very quickly under environmental stress.

Extreme environments characterized by extreme values of stress factors (i.e. toxics, pH...) often support communities of phytoplancton living at the extreme limits of their tolerance (9-11). U is very hazardous for microalgae as a heavy metal besides its radioactivity. The high U concentration in Saelices evaporation pond (25 mg L^{-1} , around 700 times higher that LC_{50} for microalgae species according US EPA Ecotox Database) indicates that these waters constitute extreme environments. Even in areas influenced by mining activities, the usual U concentration is less of 3.5 mg L^{-1} (12).

It has generally been accepted that adaptation to extreme environments is achieved gradually by selection of several mutations with minor effects following a slowly process involving long temporal scales according to Charles Darwin's axiom 'natura non facit saltum' (reviewed by Gould (13)). The early work of Goldschmidt suggested that unique mutations with large effect could have evolutionary importance, but evolutionary biologists overwhelmingly rejected Goldschmidt's work arguing that the multiple mutations of small effect are the pacemaker of adaptation (reviewed in Gould (13-14)). According to this conception, the organisms that live in these extreme environments are extremophiles that after getting their adaptation over millions of years differ very much from their mesophilic ancestors. However, adaptation of microalgae to extreme environment of uranium mining ponds Saelices could change this preconception.

Amazingly, some microalgae species were able to colonize this extremely U-contaminated pond very rapidly since mining activities started in 1960. There are few known cases where microalgae are able to colonize as quickly an extremely polluted environment, which make available a fascinating laboratory to study rapid adaptation of current microorganisms to extreme contamination.

Two Chlorophyta species (*Chlamydomonas fonticola, Dictyosphaerium ehrenbergianum*) and one Bacillariophyta species (*Pleurosigma acuminatum*) were detected in Saelices evaporation pond. Apparently microalgae from these ponds are common species that do not differ than those found in non-extreme locations.

To check this DNA fragments of *Chlamydomonas* were sequenced and compared with the N.C.B.I. database revealing as the closest specie discovered *Chl. fonticola* a current microalgae species, which live in unpolluted environments.

As expected numerous microalgae species proliferates during the yearly cycle in the Zamarra natural pond without mining activity, which serves as an indicator of natural pollution levels in that area before mining activity.

Consequently, the key question is: how could these microalgae adapt so quickly to an environment as extreme?

The first response with the microalgae are facing to environmental stress is a physiological response (i.e. acclimatization) due to modification of gene expression (15). Afterwards, when values of environmental stress exceed physiological capabilities, only a genetic response (i.e. mutations that confer resistance) can allow adaptation (16-19). The simplest genetic response is achieved by a single mutation in a single gene capable of conferring resistance. These simple mutations that confer resistance to a contaminant may occur spontaneously without the selective agent (e.g. uranium) facilitate their appearance (i.e. pre-selective pattern of appearance of mutations). By contrast, the selective agent may be facilitating mechanisms for the occurrence of these mutations that confer resistance (i.e. post-selective model).

The discussion on how the mutations occur (i.e. post-selective model where mutations occurs in response to selective agent producing a direct and specific adaptation *versus* pre-selective model where mutation occurs spontaneously by chance prior to selective agent exposure) was one of the great controversies of biology. Two prominent nuclear physicists Leo Szilard and Max Delbruck were the key to solve this biological problem employing a complex mixture of laboratory techniques and statistical analysis (20-21). But their complex procedures were not always understood and among the microbiologists even today the controversy remains.

To determine the mechanism by which mesophilic microalgae might be able to adapt to the extreme environment of uranium mine, we chose two strains of a microalgae species (*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, strains ChlaA from algae culture collection of UCM) taxonomically similar than those living in Saelices, but isolated from pristine place that had never been subjected to uranium contamination. We employ a fluctuation analysis to determine the mechanisms (i.e. physiological acclimatization, pre-selective mutations, post-selective mutations...)

that allow rapid adaptation of mesophyle microalgae to extreme environment of the uranium pond (Figure 2).

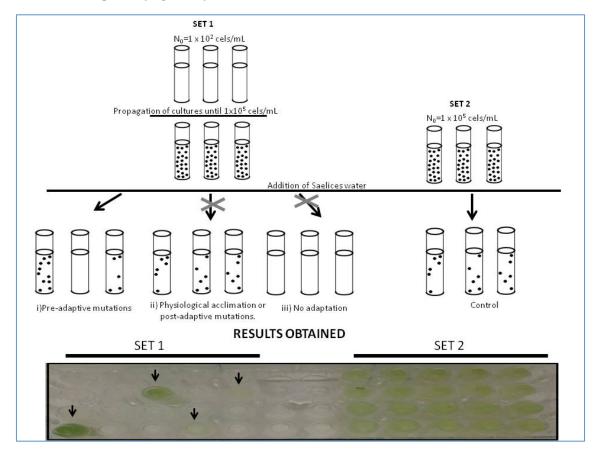


Figure 2.- Schematic diagram of the possible results of a modified fluctuation analysis by Lopez-Rodas et al., (2001), from a classic Luria and Delbrück (1943) method. Two sets of experiments were performed: in set 1, 96 cultures, founded from an initial inoculums of N_0 =10² cells, were propagated until N_t =10⁵ cells without selective conditions and then, Saelices water enriched with BG_{11} medium was added. The result obtained from set1 was i) adaptation thanks for rare pre-selective mutations occurred randomly before the exposure to Saelices water during the propagations of the cultures. The differences between the culture flasks depend in the early or late occurrence of the mutational event (arrows show the culture flasks that presented growth). The other two possible results of set1 are: ii) physiological acclimation or post-adaptive mutations (the cell number among the culture flasks must be similar) and iii) no adaption at all (empty culture flasks). In set 2, used as a control in other to sample the variance of the paternal population, the 30 replicates had initially N_0 = 10⁵ cell from the same parental culture. The result obtained in set 2 was a similar number of resistance cells in all the cultures.

A massive destruction of cells was observed in each experimental culture of both sets 1 and 2 in the fluctuation analysis with Saelices evaporation pond water. However, after further incubation during 10 weeks proliferation of living resistant cells was observed in 7 cultures of set 1 experiments of *C. reinhardtii*. Simultaneously proliferation of resistant cells was also detected in all the cultures of set 2. The fluctuation in the number of resistant cells observed in set 1 experiment significantly exceeded the fluctuation observed in set 2 controls (set 1

cultures fluctuates from more than 10^5 resistant cells ml⁻¹ to 0 resistant cells ml⁻¹, whereas all the set 2 cultures showed around 10^2 resistant cells ml⁻¹).

Consequently, the U-resistant cells arose randomly by rare, pre-selective, spontaneous mutations and not as a response to the effect of residual waters from U mining (i.e. by specific physiological acclimatization, adaptive mutants or post-selective mutations). These U-resistant mutants were isolated and maintained in BG-11 medium in the absence of the selective agent (i.e. residual waters from U mining), then confirming that the culture was able to retain resistance to residual waters of U-mining throughout successive generations.

The rapid colonization by microalgae Saelices evaporation pond can be explained following an Occam's razor line of reasoning: i) new U-resistant mutants arise prior to the uranium exposure, because mutation is recurrent; ii) prior to the uranium exposure many of these U-resistant mutants are eliminated by selection or by chance; iii) The balance between new U-resistant genotypes appeared by mutation and the U-resistant genotypes eliminated by selection will determine that a small number of U-resistant mutants are presents within microalgae populations at a given time. When uranium contamination occurs, U-sensitive wild type cells die and only the U-resistant cells are able to colonize the new extreme environment (Figure 3).

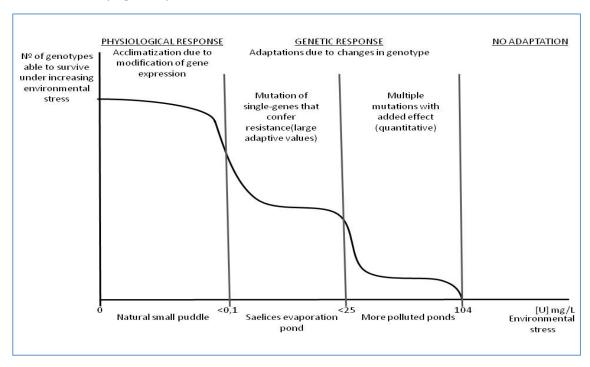


Figure 3.-Graphic work representation of the number of genotypes able to survive under an increasing environmental stress present among the studied ponds due to the uranium concentration and the adaption strategy depending in the uranium concentration.

Recent evidences suggest that mutations of single-genes that confer a large adaptive value do happen and, when competing with multiple small-effect mutations, they usually win (reviewed by Chouard (22)). In our experience over

the past 10 years we have shown that a single mutation of large effect, which occur previously to selective agent exposure and are maintained in microalgae populations as mutation-selection balance allow adaptation of microalgae to pesticides (18, 23-25), xenobiotics (26), algaecides (27-28), mine spills (29-31) volcanic effluents and thermal waters (32-33).

4. MICROALGAE ARE ABLE TO CONCENTRATE URANIUM

Once it is found that microalgae can survive in an environment with large amounts of Uranium the next step for become able to build a natural nuclear reactor is that microalgae can to concentrate uranium. However, it not seems easy that microalgae could concentrate uranium because U has not knowledge biological utility. Consequently, we look for the possibility of uranium intracellular and extracellular sequestration in the *Chlamydomonas* cells collected from the Saelices evaporation pond (containing 25 mg l-1 of uranium).

An Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS VARIAN RedTop) analysis demonstrated that *Chlamydomonas* cells bind a considerable total uranium quantity as 115 mg U g⁻¹ of dried biomass. Additionally, ICP-MS and EDX microanalysis confirmed the participation of two different mechanisms in the uranium removal: bio-adsorption to the cell wall (and bioaccumulation within the cell (Figure 4).

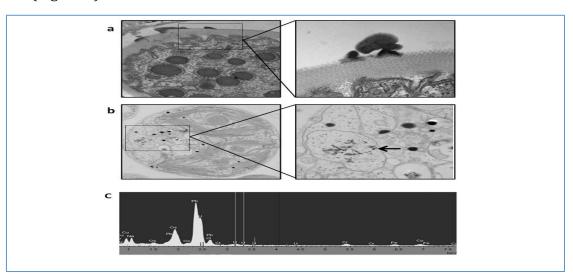


Figure 4.- TEM imagines, a) bio-adsorption in the cells wall, b) bio-accumulation of U inside the cells and c) TEM-XEDS analysis, in *Chlamydomonas sp.* Arrow detail in inlet showing uranium precipitates.

5. MICROALGAE ARE ABLE TO ENRICH URANIUM (PRODUCING ISOTOPIC FRACTIONATION ²³⁵U/²³⁸U).

In all probability the hardest challenge to meet is that microalgae could get isotopic fractionation of uranium. However, after decades of study of stable

isotopes in ecosystems is well known that biological enzymes sometimes produce isotopic fractionation (34).

As is well known, uranium found in nature consists largely of two isotopes, 238 U and the less abundant 235 U, which constitutes only approximately 0.7% of naturally occurring uranium. Most of the commercial nuclear power reactors require uranium enriched in the 235 U (35).

Biological fractionation of U has been recently tried by an indirect procedure linking bacterial uranium reduction to the isotopic partitioning (36). However, one step uranium enrichment by preferential uptake of an isotope directly using a microorganism not been implemented yet. *Chlamydomonas* isolated from the uranium polluted site of Saelices, was tested for U fractionation. For this, the uranium isotopic composition in water of Saelices evaporation pond was compared with the isotopic ratio of U bio-accumulated by *Chlamydomonas* (previously the cells were treated with EDTA to eliminate metals on the cell wall). The analysis through a High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR-ICPMS) let to obtain the isotopic distribution of uranium.

The results obtained reveal that *Clamydomonas* is able to U fractionation (δ^{235} U inside the cells with respect to 235 U in Saelices evaporation pond was -3.5 %). This spectacular result indicates that microalgae are capable of producing uranium fractionation effectively. A microalgae plant for uranium enrichment could be a real possibility.

6. CONCLUSIONS

Once more nature has won the race to the human technology: Microorganisms were able to adapt to extreme U contamination as well as accumulate and perform isotopic fractionation of uranium to become the most feasible creators of the first nuclear reactor in Oklo 1.7 billion years ago. The extreme environment of the evaporation pond in Saelices uranium mine provides some ideas of how microorganisms can build a nuclear reactor. Microalgae seem good candidates for nuclear engineers:

First of all they were able to adapt to the extreme U-contaminated environment of Saelices mining area in less than 40 years. These algae had suffered a pressure of selection in which pre-adaptive mutations that confer resistance against the toxic effect of uranium can survive.

Second efficient biological accumulation of uranium (115 mg U/g dry mass) was demonstrated.

Finally, microalgae are able to successfully carry out an isotopic fractioning of uranium.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

Many people helped us with enthusiasm and effectiveness. We highlight the contributions of the nuclear engineers D. Beaz and J. L. Valle (Westinghouse) and the scientists PhDs M. Igual, A. García Sanchez, E. Huertas and A. Delgado (CSIC). We especially appreciate the contribution of CIEMAT. To Lara de Miguel for her excellent technical support and Pedro Caravantes for his sampling help. Supported by the spanish Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación grant CTM 2012-34757 and Biotechnological Environmental Solutions (BES). Special thanks are given to Prof. M. T. Miras-Portugal.

Part of this work is reflected in the Patent P201201203. The microalgae strain is deposited in the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedures no. BEAD04-12.

8. REFERENCES

- 1. Cowan, G. A. Natural Fission Reactor. Scientific American 235, 36–47 (1976).
- 2. Meshik, A. P. <u>The Workings of an Ancient Nuclear Reactor</u>. Scientific American. In press (2005).
- 3. Kuroda, P. K. On the Nuclear Physical Stability of the Uranium Minerals. Journal of Chemical Physics 25 (4), 781–782; 1295–1296 (1956).
- 4. Gauthier-Lafaye, F.; Holliger, P.; Blanc, P.L. Natural fission reactors in the Franceville Basin, Gabon: a review of the conditions and results of a "critical event" in a geologic system. Geochimica et Cosmochimica Acta 60 (25), 4831–4852 (1996).
- 5. Meshik, A. P.; Hohenberg, C. M.; Pravdivtseva, O.V. Record of Cycling Operation of the Natural Nuclear Reactor in the Oklo/Okelobondo Area in Gabon. Physical Review Letters 93 (18), 182302 (2004).
- 6. Lovelock, J.: *The ages of gaia: A biography of our living planet;* W.W. Norton; New York; 1998, 116-117.
- 7. Markich, S.J. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. Sci. World J. 2, 707–729 (2002).
- 8. Arribas, A. Sobre el origen de las mineralizaciones españolas de uranio en rocas metasedimentarias. Bol. Geol. Min. 48, 705-711 (1987).
- 9. Costas, E.; Flores-Moya, A.; Perdigones, N.; Maneiro, E.; Blanco, J.L.; García, M.E.; López-Rodas, V. How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. New Phytol. 175, 334-339 (2007).
- Costas, E.; Flores-Moya, A.; López-Rodas, V. Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows "Noah's Arks" for photosynthesizers during the Neoproterozoic "Snowball Earth"?. New Phytol. 189, 922-932 (2008).
- 11. Seckbach, J.; Oren, A. *Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments*; In: Seckbach J. (ed.); Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments; Springer; Dordrecht; 2007, 4-25.
- 12. Desssouki, Tarik C.E.; Hudson, Jeff J.; Neal, Brian R.; Bogard, Matthew J. The effects of phosphorus additions on the sedimentation of contaminants in a uranium mine pit-lake. Water Research 39, 3055-3061(2005).

- 13. Gould, S. J.; The structure of evolutionary theory; Belknap Press; Pg 1.433. (2002) ISBN: 0-674-00613-5.
- 14. Gould, S. J. The Return of Hopeful Monsters. Natural History 86: 24, 30 (1977).
- 15. Fogg, G. E. Algal adaptation to stress- some general remarks; In: *Algal adaptation to environmental stresses. Physiological, biochemical and molecular mechanisms;* Rai, L.C.; Gaur, J.P.; eds.; Springer; Berlin, Germany: 2001; 1–20.
- 16. Sniegowski, P. D.; Lenski, R.E. Mutation and Adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. Annual review of ecology and systematic 26, 553-578 (1995).
- 17. López-Rodas, V.; Agrelo, M; Carrillo, E.; Ferrero, L. M.; Larrauri, A.; Martínotero L.; Costas, E. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. European Journal of Phycology 36, 179-190 (2001).
- 18. Costas, E.; Carrillo, E.; Ferrero L. M.; Agrelo, M.; García-Villada, L.; Juste J.; López-Rodas, V. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: The ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1- dimethylurea herbicide. Phycologia 40, 391-398 (2001).
- 19. Sniegowski, P.D. Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. New Phytologist 166, 360-362 (2005).
- 20. Luria, S.E.; Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28, 491-511 (1943).
- 21. Novick A.; Szilard L. Description of a Chemostat. Science 112, 2920:715-716 (1950). DOI: 10.1126/science.112.2920.715
- 22. Chouard, T. Revenge of the hopefull monster. Nature 463, 7283:864-867 (2010).
- 23. López-Rodas, V.; Flores-Moya, A.; Maneiro, E.; Perdigones, N.; Marva, F.; García, M.E.; Costas, E. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. Evol. Ecol. 21, 535-547 (2007).
- 24. Marva, F.; Lopez-Rodas, V.; Rouco, M.; Navarro, M.; Toro, F. J.; Costas, E.; Flores-Moya, A. Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of preselective mutations. Aquatic Toxicology 96,130–4 (2010).
- 25. Gonzalez, R.; García-Balboa, C.; Rouco, M.; Lopez-Rodas, V.; Costas, E. Adaptation of microalgae to lindane: A jew approach for bioremadiation. Aquatic Toxicology 109, 25-32 (2012).
- 26. García-Villada, L.; López-Rodas, V.; Bañares-España, E.; Flores-Moya, A.; Agrelo, M.; Martín-Otero, L.; Costas, E. Evolution of microalgae in highly stressing environments: An experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene by rare preselective mutations. Journal of Phycology 38,1074-1081(2002).
- 27. García-Villada, L.; Rico, M.; Altamirano, M.; Sánchez-Martín, L.; López-Rodas V.; Costas, E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: Characterization and future implications in the use of copper sulphate as an algaecide. Water Research 38, 2207-2213(2004).
- 28. Costas, E.; Gonzalez, R.; Lopez-Rodas, V.; Huertas E. Mutation of microalgae from antifouling sensitivity to antifouling resistance allowa phytoplankton dispersal through ships' biofouling. Biol. Invasions (2013). DOI 10.1007/s10530-012-0405-8.
- 29. Baos, R.; Garcia-Villada, L.; Agrelo, M.; López Rodas, V.; Hiraldo, F.; Costas, E. Short-Term adaptation of microalgae in highly stressfull environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. Eur. J. Phycol. 37, 593-600 (2002).
- 30. Lopez-Rodas, V.; Marvá, F.; Costas, E.; Flores-Moya, A. Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to

- selection of pre-selective mutants. Environmental Experimental Botany 61, 43-48 (2008a).
- 31. Lopez-Rodas, V.; Marvá, F.; Rouco, M.; Costas, E.; Flores-Moya, A. Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. Chemosphere 72, 703-707 (2008).
- 32. Lopez-Rodas,V.; Perdigones,N.; Marvá,F.; Maneiro,E.; Rouco, M.; Delgado, A.; Flores-Moya, A. & Costas, E. Living in Vulcan's forge: Algal adaptation to stressfull geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as result of pre-selective mutation. Phycological Research 57:111-117 (2009).
- 33. Costas, E.; Flores-Moya, A.; López-Rodas, V. Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters is achieved by single mutations: were extreme environments 'Noah's Arks' for photsynthesizers during the Neoproterozoic 'snowball Earth'? New Phytol. 180, 922–32 (2008).
- 34. Hayes, I. M. (1982). Fractionation: an introduction to isotope measurements and terminology. Spectra 8, 3–8
- 35. Czerwinski, K. R. & Martin F. P. Uranium enrichment using microorganisms. Patent n^{o} : US 7,452,703 B1. United States (2008).
- 36. Basu, A.; Sanford, R.; Johnson, T.M. & Lundstrom, C. Microbial Uranium reduction: Isotopic fractionation factors for bacteria with diverse metabolism. PhD Tesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, 83-113 (2012).

ARTÍCULO

Presencia de ácidos grasos trans en productos de bollería y de aperitivo

Iciar Astiasarán*, Diana Ansorena, Andrea Echarte, Rebeca Ollé, María Pascual

Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, Irunlarrea s/n, 31008 Pamplona, Spain

*e-mail: iastiasa@unav.es

Recibido el 29 de octubre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, № 4 (2013), pag. 646-657

RESUMEN

Los productos de bollería y los snacks han sido elaborados tradicionalmente con grasas parcialmente hidrogenadas, implicando altos porcentajes de grasa en dichos alimentos y una alta presencia de ácidos grasos trans (AGT). En este trabajo se analizó el contenido en grasa, AGT y ácidos grasos saturados (AGS) de productos comerciales correspondientes a bollería (8) y snacks (4), adquiridos en los dos últimos años. La cantidad de grasa en estos productos fue alta (20-32%). Sin embargo, la cantidad de AGT no superó la media de 0,2 g/100 g producto. La cantidad de AGS fue de 4-18 g/100 g producto. Se puede concluir que, si bien la cantidad total de grasa y de AGS sigue siendo elevada en este tipo de productos, su contenido en AGT no lo es, y por tanto, no debería emplearse la cantidad de AGT como argumento para su no recomendación.

Palabras clave: Grasas hidrogenadas; Fracción lipídica; Tablas de composición de alimentos.

ABSTRACT

Trans fatty acids in bakery products and snacks

Bakery products and snacks have been traditionally elaborated with partially hydrogenated oils, leading to high fat content and high trans fat (TFA) content in these products. In this paper we analyzed the fat content, TFA and saturated fatty acids (SFA) of commercial products (bakery 8, and snacks 4), purchased during the last two years. The amount of fat in these products was high (20-32%). However, mean values for TFA were always lower than 0.2g/100g product. The amount of SFA was 4-18g/100g product. It can be concluded that, although the total fat and SFA remained still high in these types of products, TFA content was

low, and it can not be used as a reason for not recommending their intake.

Keywords: Hydrogenated fats; Lipid fraction; Food composition tables.

1. INTRODUCCIÓN

La fracción lipídica de los alimentos ha sido estudiada en las últimas décadas con gran profusión, al ir acumulándose evidencias de la importancia de la ingesta de esta fracción en la salud.

Las evidencias científicas existentes en la actualidad no dejan lugar a dudas sobre los efectos negativos de los ácidos grasos trans (AGT) sobre la salud. Tanto estudios observacionales como de intervención nutricional han puesto de manifiesto su efecto adverso en los perfiles plasmáticos de lipoproteínas (incrementan el LDL-colesterol, disminuyen el HDL-colesterol), su efecto proinflamatorio (incrementan el tnf-α, la interleukina-6 y la proteína C reactiva), su capacidad para alterar la función endotelial, o su incidencia negativa sobre la sensibilidad a la insulina (1). Trabajos recientes concluyen que los efectos sobre la salud de los ácidos grasos trans son incluso mayores de lo que cabría esperar atendiendo únicamente a la modificación que ejercen sobre los niveles de lipoproteínas, y apuntan al desconocimiento que aún se tiene de su preciso mecanismo de acción (2). En definitiva, el consumo de ácidos grasos trans procedentes de grasas parcialmente hidrogenadas afecta negativamente a un gran número de factores de riesgo cardiovascular e incrementa el riesgo de eventos coronarios (3-4). Desde el punto de vista del consumidor, pese a que son considerados como compuestos nocivos, se tiene, en general, un escaso conocimiento de este tipo de ácidos grasos y de sus fuentes alimentarias (6).

La formación de ácidos grasos trans durante los procesos industriales tradicionales de hidrogenación y la consecuente acumulación de los mismos en las grasas hidrogenadas y parcialmente hidrogenadas se conoce también desde hace varias décadas. Hay una serie de grupos de alimentos en cuya elaboración se han empleado tradicionalmente grasas hidrogenadas, ricas por tanto en AGT. Se trata, en general, de productos que requieren para su elaboración un ingrediente graso con unas determinadas características de textura y estabilidad frente a la oxidación y los tratamientos térmicos, propiedades que les proporciona este tipo de grasas hidrogenadas, y que además son viables desde un punto de vista económico.

Según datos del año 2009, la mayor fuente de AGT en alimentos comerciales consumidos por la población española eran alimentos tipo fast food, aperitivos, productos de bollería industrial, margarinas y sopas deshidratadas (6). Una revisión de tablas de composición y bases de datos de hace apenas un lustro pone de manifiesto que, efectivamente, el consumo de este tipo de alimentos proporciona cantidades significativas de ácidos grasos trans, siendo éste uno de los

factores, aunque no el único, que se tienen en cuenta en la recomendación del consumo ocasional de estos alimentos por parte de las organizaciones que desarrollan guías alimentarias. En España, la pirámide alimentaria propuesta por la SENC en el 2004 muestra en su cúspide a este tipo de productos, indicando por tanto la no recomendación de dichos alimentos.

Determinar la cantidad de AGT que consume una población es muy difícil usando métodos tradicionales como la evaluación de la dieta o como las tablas de composición de los alimentos (7). Además, en muchas ocasiones los datos del contenido en AGT en las tablas son inexistentes o incompletos (8), e incluso varían para un mismo producto dependiendo de las marcas comerciales analizadas (9). En cualquier caso, las recomendaciones de las sociedades internacionales coinciden en afirmar que el consumo diario de AGT debe ser lo más bajo posible. Tanto la OMS (10), como la AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (11) concretan que el consumo de AGT no debe superar al 1% de la energía total consumida (2000 kcal = 2 g).

De forma paralela a la evidencia científica acumulada sobre los efectos negativos de los AGT, se han ido desencadenando acciones regulatorias encaminadas a informar al consumidor sobre la presencia de AGT a través de las etiquetas, así como a limitar la presencia de estos compuestos en los alimentos. De hecho, la eliminación del empleo de grasas parcialmente hidrogenadas con AGT de los alimentos se ha descrito como una de las intervenciones más directas en salud pública para la mejora de la dieta y la reducción del riesgo de enfermedades no contagiosas (12). La Figura 1 recoge los principales hitos tanto científicos como legislativos que se han producido en este sentido a lo largo de las dos últimas décadas. Todas estas medidas están conduciendo a una significativa modificación en las formulaciones de productos del empleo de grasas en las que tradicionalmente el porcentaje de AGT era alto. Entre las técnicas más habituales se encuentran la reformulación a través de uso de grasas más insaturadas, la transesterificación o modificaciones en la tecnología de hidrogenación de grasas vegetales (13-14). Estudios preliminares apuntan a que estas modificaciones en la composición de los alimentos, con la tendencia a la disminución de AGT, tienen un efecto positivo sobre la disminución de los niveles de AGT en plasma (15-16).

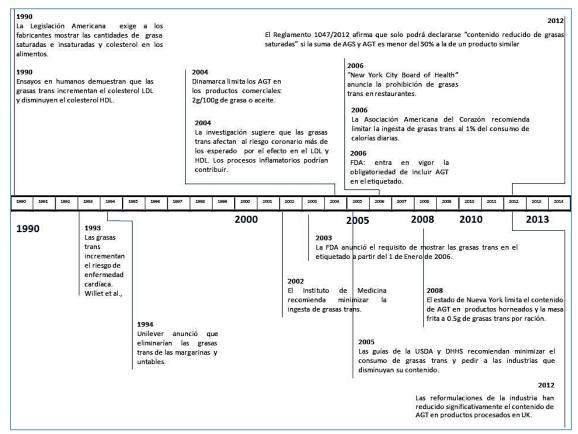


Figura 1.- Cronograma de las recomendaciones y acciones legislativas en relación con la presencia de ácidos grasos trans en alimentos durante los últimos años.

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en el análisis de AGT y AGS en muestras comerciales de productos de bollería y snacks recogidas en los últimos dos años comparándolos con las recomendaciones actuales de ingesta, así como, en algunos casos, con las cantidades máximas establecidas por la legislación vigente de algunos países.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los alimentos analizados se adquirieron en establecimientos comerciales de la zona. Los productos de bollería escogidos fueron ensaimadas, cruasanes, cruasanes de chocolate, palmeras, sobaos, *doughnuts*, *doughnuts* de chocolate, bizcochos, y se incluyó también pan de molde como producto de panadería. Los snacks analizados fueron palomitas para microondas, conos de maíz, patatas fritas de bolsa y crackers. Para cada producto se escogieron tres marcas comerciales (dos marcas blancas y una marca líder), y para cada marca se analizaron tres lotes diferentes por cuadruplicado. Los alimentos pertenecientes a cada lote se homogeneizaron, congelaron y almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. La determinación del contenido en grasa se realizó por extracción por Soxhlet con éter de petróleo (17), requiriendo una hidrólisis ácida previa (18) en el caso de algunos alimentos. La determinación del perfil lipídico en muestras de grasa extraída por método de Folch (19) se realizó por cromatografía de gases previa

formación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (derivatización) (20). Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem XL equipado con una columna capilar y detección de ionización de llama. La temperatura del inyector se fijó a 250 °C y la del detector a 260 °C. La temperatura del horno se programó durante 10 minutos a 175 °C hasta que aumentase a 200 °C (10 °C/min), después hasta 220 °C (4 °C/min) y se mantuvo a esta temperatura 15 minutos. Se usó hidrógeno a una presión de 20,5 psi. La identificación de los ésteres metílicos se realizó comparando los tiempos de retención de los picos de la muestra con los picos obtenidos de la inyección previa de estándares. Los patrones individuales metilados de Sigma (St. Louis, MO, USA) se utilizaron para los ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados cis y el trans t-Palmitoleico C16:1 Δ9t, Elaídico C18:1 Δ9t, Brasídico C20:1 Δ13t. Para los del ácido linoleico, se utilizó la mezcla de los isómeros del ácido linoleico cis/trans de Sigma (50% de C18:2 Δ9t, 12t; 20% C18:2 Δ9c, 12t y C18:2 Δ9t, 12c; 10& C18:2 Δ9c, 12c). El orden de elución en el caso de la mezcla de los isómeros (isómeros del ácido linoleico cis/trans) también se tuvo en cuenta (Sigmaldrich.com - FAME Application guide), y finalmente, para confirmar la identificación se pinchó la muestra con cada patrón individual. La cuantificación de los ácidos grasos se basa en el método del patrón interno, usando ácido heptadecanoico metilado (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Los resultados mostrados en las gráficas (diagramas de caja) son: los valores (g/100 g producto) máximo y mínimo para cada producto (representados por las barras laterales de las cajas), el cuartil 1 (límite izquierdo de la caja), la mediana (barra vertical en el interior de la caja), el cuartil 3 (límite derecho de la caja) y los valores atípicos (representados como puntos). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa StataIC 12, e incluyó, para cada producto, los valores obtenidos de las tres marcas comerciales analizadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el punto de vista cuantitativo se puede afirmar que, en general, los productos de aperitivo analizados y, especialmente de bollería, presentan altos contenidos de grasa (Figuras 2 y 3). En el caso de ensaimadas, palmeras, cruasanes, sobaos, *doughnuts* de chocolate, los valores medios fueron del orden de 25-30% de grasa. En el caso de los aperitivos, los valores medios oscilaron entre un 20-30%, excepción hecha de las palomitas. Una de las marcas comerciales de este producto fue una fórmula sin grasas o aceites añadidos, lo que, obviamente contribuyó a su menor contenido en grasa (únicamente un 3%) y menor valor energético. Así, aunque el valor medio para este producto se situó en 15,2 g grasa/100 g, la mediana fue de 19,7 g/100 g. La alta cantidad de grasa de la mayoría de los alimentos analizados en este trabajo es responsable de su alto valor energético, que constituye uno de los inconvenientes desde el punto de vista nutritivo.

Conviene además no olvidar que existe una elevada evidencia científica de la relación existente entre una alta ingesta de grasa y la incidencia de cáncer. En este sentido, la FDA tiene aprobada una Health claim (declaración de salud) en la que señala que "El desarrollo del cáncer está afectado por diversos factores. Una dieta baja en grasa puede reducir el riesgo de algunos tipos de cáncer".

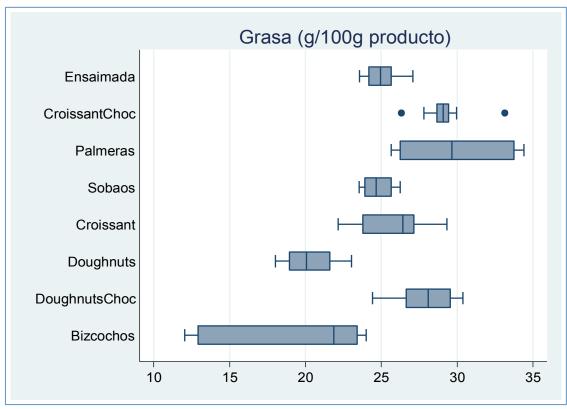


Figura 2.- Contenido en grasa de los productos de bollería (g/100 g).

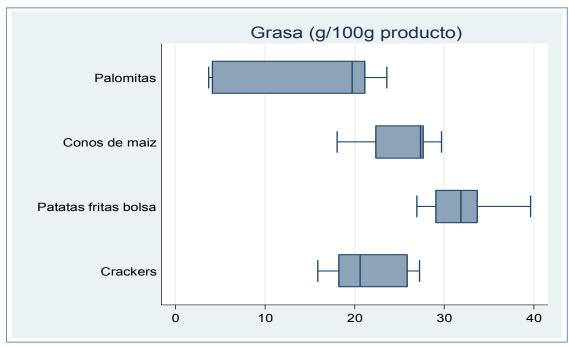
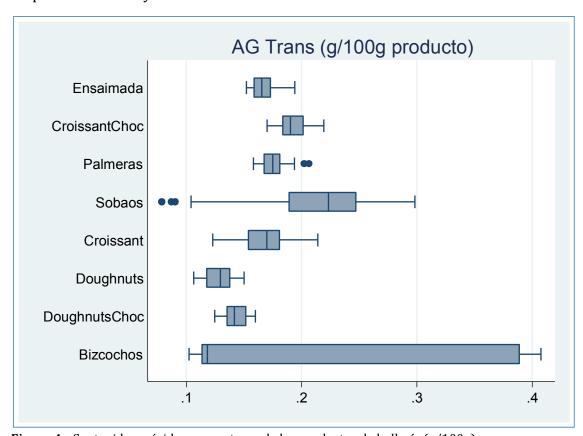


Figura 3.- Contenido en grasa de los aperitivos (g/100 g).

Sin embargo, el contenido en AGT que presentaron los productos analizados no parece, a día de hoy, ser un argumento convincente para la limitación de la ingesta de este tipo de productos. El contenido medio de AGT en los productos de bollería fue inferior 0,2 g/100 g de producto, a excepción de sobaos y bizcochos, donde el valor medio fue de 0,21 g/100 g (Figura 4). En estos dos productos se observó una mayor dispersión de los datos que en el resto, probablemente debido a la mayor diversidad cualitativa y cuantitativa de ingredientes que forman parte de estas formulaciones. En el caso de los sobaos, la mayor o menor presencia de grasas de origen animal (mantequilla) puede afectar al contenido en AGT que, aunque con un perfil de isómeros distinto, aportan AGT a la suma total de esta fracción. En el caso de los bizcochos, aunque la media se situó en 0,21, la mediana fue de 0,12 g/100 g, apuntando a que fue una de las tres marcas analizadas la responsable del mayor valor medio total.



 $\textbf{Figura 4.-} \ Contenido \ en \ \'acidos \ grasos \ trans \ de \ los \ productos \ de \ boller\'(a \ (g/100g).$

En los snacks, los valores medios oscilaron entre 0,07 g/100 g (palomitas) y 0,19 g/100 g (patatas fritas de bolsa). En este tipo de productos se observó, en general, una baja dispersión de los datos, con valores similares para las medias y medianas de los datos. En el caso de las patatas fritas de bolsa una de las marcas mostró valores atípicos, significativamente superiores a los obtenidos para el tercer cuartil, representados con puntos en el gráfico (Figura 5). En el caso de las palomitas para microondas, la cantidad de AGT de una de las marcas fue menor

AG Trans (g/100g producto)

Palomitas

Conos de maiz

Patatas fritas bolsa

Crackers

0 1 2 3 4

(0,02) que en las otras dos (0,09-0,11), debido a que fue elaborada sin grasas añadidas y por tanto su contenido de grasa fue menor.

Figura 5.- Contenido en ácidos grasos trans de los aperitivos (g/100 g).

Durante los años 1995-1996 se llevó a cabo en Europa el estudio Transfair Study, cuyo objetivo fue el de valorar el consumo de AGT en catorce países europeos (21).

En España, la ingesta de AGT se estimó en 2,1 g/día, semejante al resto de países mediterráneos y significativamente inferior a países como Islandia (5,4 g/día), Holanda (4,3 g/día) o Bélgica (4,1 g/día). En relación con productos analizados en este trabajo, el Transfair mostró valores de hasta un 15-32 % (AGT sobre grasa total) en productos de bollería como cruasanes o *doughtnuts* (22) o valores de hasta un 27-34% en palomitas (23). En Estados Unidos, las ingestas diarias estimadas mediante un cuestionario de frecuencias de consumo fueron de 3-4 g/día (24).

Estudios posteriores han puesto de manifiesto la disminución de estas cifras, situándolas en un consumo de 1,3 g/persona/día (25). En Europa, todavía hay, a día de hoy, países donde la ingesta de este tipo de grasa está en valores capaces de incrementar significativamente el riesgo cardiovascular (26).

Entre 2002 y 2003 se llevó a cabo una investigación con 253 muestras de distintos alimentos altos en grasa comercializados en Dinamarca (27). Este país fue el primero en legislar el contenido máximo de AGT en los alimentos, estableciendo

un valor límite de un 2% de AGT sobre el contenido de grasa total del alimento. A pesar de haber entrado ya en vigor la norma, 64 muestras contenían más del 2% de AGT (5 de los 19 productos de patata, 3 de las 4 patatas fritas, al igual que 2 de las 17 muestras de palomitas de microondas). Otro trabajo del año 2006 con muestras de 26 países puso de manifiesto que un 40% de los productos de bollería y un 57% de las muestras de palomitas superaron el valor del 2% AGT sobre el contenido en grasa (28). De hecho, en el año 2008 aún se encontraron valores un 23,2% para palomitas (29). En nuestro trabajo, prácticamente todos los productos mostraron valores medios inferiores a 0,7% de AGT (referido a 100 g de grasa), salvo los sobaos (0,9%) y los bizcochos (1,37%). En el caso de este último producto, una de las marcas superó el 2%, llegando a un máximo de 3,15%. Sería el único caso entre todas las marcas y productos analizados que superaría el 2% de AGT (referido a 100 g de grasa) establecido por la legislación danesa como límite máximo para este valor.

Una de las preocupaciones en relación con la reformulación de productos para reducir su contenido en AGT es el potencial incremento en la fracción de ácidos grasos saturados (AGS), cuyo efecto sobre el incremento de los valores de LDL colesterol es ampliamente conocido. En este sentido, Mozaffarian et al. (30) analizaron un gran número de alimentos comercializados en supermercados y de venta en restaurantes, concluyendo que no se detectó una significativa mayor presencia de AGS tras las recomendaciones o prohibiciones de disminución de AGT en alimentos en Estados Unidos.

En este trabajo los valores más altos para el contenido en AGS en los productos de bollería fueron para los *doughnuts* con chocolate (18,02 g/100 g producto) y las palmeras (16,76 g/100 g), estando el resto por debajo de 15 g/100 g (Figura 6). Estos valores supusieron un aporte de AGS en los productos de bollería comprendido entre un 21 y un 33% del valor energético total en estos alimentos. En el caso de los aperitivos (Figura 7), todos los valores medios fueron inferiores a 9,5 g AGS/100 g, siendo especialmente bajos los detectados en las patatas fritas de bolsa (4,08 g/100 g) donde los aceites de fritura fueron monoinsaturados o poliinsaturados. En estos productos, el aporte de AGS fue comparativamente menor, con valores comprendidos entre un 7-17% del valor energético total.

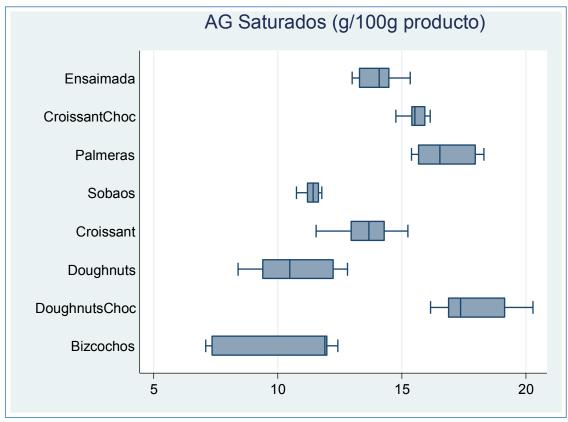


Figura 6.- Contenido en ácidos grasos saturados de los productos de bollería (g/100 g).

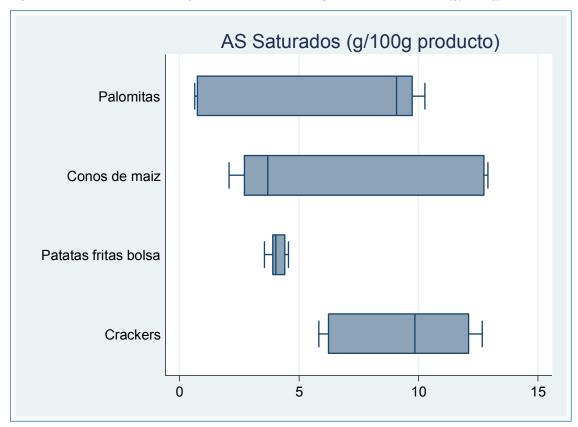


Figura 7.- Contenido en ácidos grasos saturados de los aperitivos (g/100 g).

4. CONCLUSIONES

Estudios previos de nuestro grupo de investigación apuntaron una reducción en el contenido de AGT en algunos productos de bollería adquiridos en el mercado español (31). Este trabajo amplía el elenco de productos en los que se observa esta tendencia, poniendo de manifiesto la importancia de seguir actualizando la información acerca de la composición de la fracción lipídica de los alimentos, y en especial acerca de su contenido en AGT. Estos estudios son especialmente importantes para establecer pautas dietéticas apropiadas basadas en los efectos de los componentes de los alimentos sobre la salud.

6. REFERENCIAS

- 1. Mozaffarian, D.; Aro, A.; Willett, W.C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. Eur. J. Clin. Nutr. 63 Suppl 2, S5-21 (2009).
- 2. Brouwer, I. A.; Wanders, A. J.; Katan, M. B. Trans fatty acids and cardiovascular health: research completed? Eur. J. Clin. Nutr. 67, 541-547 (2013).
- 3. Uauy, R.; Aro, A.; Clarke, R.; Ghafoorunissa, R.; L'Abbe, M.; L'Abbé, M R Mozaffarian, D.; Skeaff, C.M.; Stender, S.; Tavella, M. WHO Scientific Update on trans fatty acids: summary and conclusions. Eur. J. Clin. Nutr. 63, S68-S75 (2009).
- 4. Willett, W.C. Dietary fats and coronary heart disease. J. Intern. Med. 272, 13-24 (2012).
- 5. Nasser, R.; Cook, S.; Bashutski, M.; Hill, K.; Norton, D.; Coleman, J.; Walker, S.; Charlebois, S. Consumer perceptions of trans fats in 2009 show awareness of negative effects but limited concern regarding use in snack foods. Appl Physiol Nutr Metab 36, 526-32 (2011).
- 6. Fernandez-San Juan, P. Trans fatty acids (TFA): sources and intake levels, biological effects and content in commercial Spanish food. Nutricion Hospitalaria 24, 515-520 (2009).
- 7. L'Abbe, M.R.; Stender, S.; Skeaff, M.; Skeaff, C.M.; Ghafoorunissa, R.; Tavella, M. Approaches to removing trans fats from the food supply in industrialized and developing countries. Eur. J. Clin. Nutr. 63, S50-S67 (2009).
- 8. Skeaff, C. M. Feasibility of recommending certain replacement or alternative fats. Eur. J. Clin. Nutr. 63 Suppl 2, S34-49 (2009).
- 9. Otite, F.; Jacobson, M.; Dahmubed, A.; Mozaffarian, D. Trends in trans fatty acids reformulations of US supermarket and brand-name foods from 2007 through 2011. Prev Chronic Dis 10, E85 (2013).
- 10. Nishida, C.; Uauy, R.; Kumanyika, S.; Shetty, P. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. Public Health Nutr. 7, 245-50 (2004).
- 11. Agence Française de Securite des Aliments (AFSSA). Risques et bénéfices, pour la santé des acides grans trans apportés par les aliments. Recommandations. (2005).
- 12. Downs, S.M.; Thow, A.M.; Leeder, S.R. The effectiveness of policies for reducing dietary trans fat: a systematic review of the evidence. Bull. World Health Organ. 91, 262-269 (2013).
- 13. Menaa, F.; Menaa, A.; Menaa, B.; Treton, J. Trans-fatty acids, dangerous bonds for health? A background review paper of their use, consumption, health implications and regulation in France. Eur. J. Nutr. 52, 1289-1302 (2013).
- 14. Menaa, F.; Menaa, A.; Treton, J.; Menaa, B. Technological approaches to minimize industrial trans fatty acids in foods. J. Food Sci. 78, R377-R386 (2013).

- 15. Schwenke, D.; Foreyt, J.P.; Miller, E.R.; Reeves R.S.; Vitolins M.Z.; Oxidative Stress Subgroup of the Look AHEAD Research Group. Plasma concentrations of trans fatty acids in persons with type 2 diabetes between September 2002 and April 2004. Am. J. Clin. Nutr. 97, 862-71 (2013).
- 16. Baylin, A. Secular trends in trans fatty acids: decreased trans fatty acids in the food supply are reflected in decreased trans fatty acids in plasma. Am. J. Clin. Nutr. 97, 665-6 (2013).
- 17. AOAC. Fat (crude) or ether extract in meat. 960.39. In W. Horwitz (Ed.), Official method of analysis. (17th ed., pp. 12-13). Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists. (2002).
- 18. ISO-1443, 1973. Determinación de grasa total con hidrólisis previa.
- 19. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226:497-509 (1957).
- 20. AOAC. Methyl esters of fatty acids in oils and fats. 969.33. In Official methods of analysis. (pp. 19-20). Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists. (2002).
- 21. van Poppel, G.; van Poppel, G.; Leth, T.; Gevers, E.; Van Amelsvoort, J.; Kafatos, A. Lanzmann Petithory, D.; Kafatos, A.; Aro, A. TransFatty acids in foods in Europe: the TRANSFAIR study. J Food Compos Anal 11, 112-136 (1998).
- 22. van Erp-baart, M.A.; Couet, C.; Cuadrado, C.; Kafatos, A.; Stanely, J.; van Poppel, G. TransFatty acids in bakery products from 14 European countries: the TRANSFAIR study. J Food Compos Anal 11, 161-169 (1998).
- 23. Aro, A.; Amaral, E.; Kesteloot, H.; Rimestad, A., Thamm, M.; van Poppel, G. TransFatty Acids in French Fries, Soups, and Snacks from 14 European Countries: The TRANSFAIR Study. J Food Compos Anal 11, 170-177 (1998).
- 24. Craig Schmidt, M. World-wide consumption of trans fatty acids. Atherosclerosis. Supplement 7, 1-4 (2006).
- 25. Doell, D.; Folmer, D.; Lee, H.; Honigfort, M.; Carberry, S. Updated estimate of trans fat intake by the US population. Food additives & contaminants. Part A. Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 29, 861-74 (2012).
- 26. Stender, S.; Astrup, A.; Dyerberg, J. A trans European Union difference in the decline in trans fatty acids in popular foods: a market basket investigation. BMJ open 2, e000859-e000859 (2012).
- 27. Leth, T.; Jensen, H.G.; Mikkelsen, A.A.; Bysted, A. The effect of the regulation on trans fatty acid content in Danish food. Atherosclerosis. Supplement 7, 53-6 (2006).
- 28. Stender, S.; Dyerberg, J.; Bysted, A.; Leth, T.; Astrup, A. A trans world journey. Atherosclerosis. Supplement 7, 47-52 (2006).
- 29. Albers, M.J.; Harnack, L.J.; Steffen, L.M.; Jacobs, D.R. 2006 marketplace survey of trans-fatty acid content of margarines and butters, cookies and snack cakes, and savory snacks. J. Am. Diet. Assoc. 108, 367-70 (2008).
- 30. Mozaffarian, D.; Jacobson, M.; Greenstein, J. Food reformulations to reduce trans fatty acids. N. Engl. J. Med. 362, 2037-9 (2010).
- 31. Ansorena, D.; Echarte, A.; Olle, R; Astiasaran, I. 2012: No trans fatty acids in Spanish bakery products. Food Chem. 138, 422-429 (2013).

ARTÍCULO

La implantación de la prestación farmacéutica en el Seguro Obligatorio de Enfermedad (1944-1955)

Gloria Redondo Rincón, Antonio González Bueno*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain.

* e-mail: agbueno@ucm.es

Recibido el 20 de noviembre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 4 (2013), pag.658-688

RESUMEN

La prestación farmacéutica del seguro obligatorio de enfermedad se comenzó a proporcionar a los obreros fijos en el año 1944, al igual que la asistencia de medicina general; estas serían las primeras prestaciones sanitarias previstas en el *Reglamento...* que desarrollaba la ley del seguro de enfermedad, sancionado el 11-XI-1943. El 29 de noviembre de 1951 se aprobó el primer *Petitorio...* de medicamentos y productos farmacéuticos que podrían recetarse a los beneficiarios del seguro de enfermedad; el documento serviría de base para la suscripción de conciertos entre la Jefatura Nacional del Seguro Obligatorio de Enfermedad y los laboratorios farmacéuticos. En este estudio analizamos el proceso que llevó a cabo la implantación de la prestación farmacéutica y su puesta en funcionamiento durante sus primeros años.

Palabras clave: Historia de la Farmacia; Siglo XX; Seguros Sociales.

ABSTRACT

The implantation of pharmaceutical assistance in the Obligatory Insurance of Disease (1944-1955)

Pharmaceutical services in the sickness health insurance in Spain began providing permanent workers in 1944, as well as general medical care, they would be the first health benefits under regulation which developed the Health Insurance Act, adopted on October 11, 1943. On November 29, 1951 approved the first *Petitorio...* [Petitionary] of medicinal products that may be prescribed to beneficiaries of health insurance, the document would be the basis for subscription concerts between the Jefatura Nacional del Seguro Obligatorio de

Enfermedad [National Headquarters of the Sickness Insurance] and pharmaceutical laboratories. In this study we examine the process that led to the implementation of pharmaceutical services and their operation during its early years.

Keywords: History of Pharmacy; Twentieth Century; Social Insurance.

1. Un largo camino

El 14 de diciembre de 1942 se promulgaba la ley mediante la que se establecía en España el seguro obligatorio de enfermedad (BOE 27-XII-1942); algo menos de un año después, el 11 de noviembre de 1943, se aprobó el reglamento para su desarrollo (BOE 28-XI-1943). Era el final de un largo camino, iniciado años atrás (1).

Apenas finalizada la guerra civil, el 9 de septiembre de 1939, el Ministro de Agricultura –encargado interinamente de la Cartera de Trabajo-, Joaquín Benjumea y Burín (1878-1963), firmaba la orden por la que el nuevo Estado se obligaba a retomar la tramitación del proyecto de unificación de seguros sociales, elaborado por el Gobierno de la II República, y que había visto la luz en la *Gaceta de Madrid*, a fines de mayo de 1936, bajo la firma de Joan Lluhí Vallescá (1897-1944), quien fuera Ministro de Trabajo, Sanidad y Previsión Social. El proyecto republicano de 1936 llevaba a término una larga labor de información, debate y preparación de los colectivos implicados, respetando lo contenido en los convenios de la Organización Internacional de Trabajo, ratificados por España, a propuesta del ministro Francisco Largo Caballero (1869-1946), mediante sendas leyes aprobadas en abril de 1932 (2).

En algo menos de tres meses, el Instituto Nacional de Previsión, el organismo responsable de la redacción técnica del proyecto legislativo republicano y a quien Joaquín Benjumea encargó la 'actualización' de la norma, redactó un documento de bases para la preparación de un proyecto de ley sobre seguros sociales unificados, remitido al Ministerio de Trabajo el 3 de diciembre de 1939 (3); la propuesta no prosperó.

En mayo de 1941 ocupará la Cartera de Trabajo José Antonio Girón de Velasco (1911-1995), bajo su dirección se emprendió una nueva vía, fuera de un proyecto de unificación de seguros, basada en los principios del Fuero del Trabajo aprobado en plena guerra civil (4).

Bajo esas nuevas premisas, se promulgó la ley del seguro de enfermedad obligatorio de 1942; siguiendo las máximas establecidas en los convenios internacionales, se designó al Instituto Nacional de Previsión como administrador del seguro; pero la parcela de mayor interés social y económico, el servicio médico,

se encomendó a la 'Obra 18 de Julio'; con esta amplia función se esperaba una repercusión social positiva de la imagen de la Falange Española y, por extensión, del Gobierno del general Franco (5).

2. Las duras negociaciones entre el Instituto Nacional de Previsión y los representantes farmacéuticos

El artículo treinta y dos de la ley del seguro obligatorio de enfermedad establecía que el Instituto Nacional de Previsión debía concertar, con el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, un convenio mediante el que se garantizara el buen servicio de la dispensación de medicamentos por todas las farmacias, con una tarifa reducida, especial para el Seguro (6). El mismo artículo preveía que, si no se llegase a suscribir el convenio en un plazo de dos meses, el Instituto instalaría farmacias propias y, donde estas no se establecieran, el Ministerio de Trabajo fijaría una tarifa obligatoria. Teniendo en cuenta esta previsión legal, la organización farmacéutica comenzó, sin demora, los trabajos para suscribir el convenio.

De manera paralela, en el otoño de 1943, el Gobierno decidió revisar el precio de todas las 'especialidades farmacéuticas' que estaban en el mercado (7). Era fundamental el precio de venta de los medicamentos, teniendo en cuenta la elevada libertad de prescripción que tendrían los médicos del Seguro; a la vez, en esa revisión se analizaría la utilidad del medicamento para la sanidad nacional y se valoraría su posible repercusión en las cantidades destinadas a las importaciones de materias primas o del producto final; una cuestión fundamental en una política económica autárquica, como la pretendida durante estos años (8).

A lo largo del primer semestre de 1944, desde el Ministerio de Trabajo se dictan las disposiciones iniciales que definen cómo ha de realizarse la prestación farmacéutica: a los asegurados se les garantiza la libre elección de farmacia (9), a la par que se encomienda al Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos el establecer los medios para conseguir este fin; también se establece la forma de presentación de facturas, por intermedio de los Colegios, y su cobro, a través de sus correspondientes tesorerías (10); estas normas, redactadas por la corporación farmacéutica, quedaban sometidas a la conformidad de la Dirección General de Previsión (Ministerio de Trabajo) quien ejercía así su 'tutela' sobre el colectivo farmacéutico (11).

En plena canícula, el 13 de julio de 1944, el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos remitió al Instituto Nacional de Previsión un anteproyecto de bases del posible concierto y la correspondiente tarifa de medicamentos (12); este primer convenio se firmó el 18 de agosto de este 1944, bajo la dura presión que significaba la apertura de oficinas de farmacia propias del Seguro de Enfermedad; el acuerdo establecía un pago diferido de los medicamentos suministrados por las farmacias a los beneficiarios. Probablemente

fuera la mejor de las negociaciones posibles, cualquier otra solución hubiera perjudicado seriamente al colectivo farmacéutico establecido.

Aún con un convenio en trámite -aunque ya pactada su aprobación-, el Consejo General de Colegios de Farmacéuticos dictó una circular, remitida a las Juntas de Gobierno de los Colegios de todo el territorio nacional, firmada el 14 de agosto de 1944 por el presidente del Consejo General, Paulino Borrallo Nueda (1896-1972); en ella se daban instrucciones sobre la identificación de los asegurados al presentarse en las farmacias para adquirir los medicamentos y acerca de la cumplimentación de las recetas y su facturación (13). También se indicaba que las oficinas de farmacia estaban obligadas a dispensar todas las recetas prescritas por los facultativos de las entidades concertadas o colaboradoras del Seguro y se establecía el plazo de liquidación de las deudas a la farmacia: "los Colegios procederán a la tasación y facturación a los farmacéuticos en los veinte primeros días de cada mes" (14). El servicio de la prestación farmacéutica comenzó a regir el primero de septiembre de 1944 (15); unos meses antes, en junio de este 1944, se había publicitado, en la prensa, un anuncio de la Caja Nacional del Seguro de Enfermedad conteniendo una convocatoria destinada a los laboratorios nacionales que estuvieran interesados en la inclusión de medicamentos en un Petitorio... del Seguro (16), cuya aprobación habría de prolongarse una decena de años.

El convenio firmado en 1944 entre el Instituto Nacional de Previsión y el Consejo General de Colegios estuvo, desde sus inicios, sujeto a polémica; sobre los problemas de su aplicación giró el discurso de toma de posesión de Ramón Turrientes de Miguel (1890-1982) como nuevo presidente del Consejo General (17), en sustitución de Paulino Borrallo, pronunciado el 10 de octubre de 1945; en él animó a los farmacéuticos "para que se sacrifiquen por el éxito del Seguro de Enfermedad, aunque pide a las autoridades que no los conviertan en víctimas" (18). Durante el pleno del Consejo General de Colegios, celebrado el 24 y 25 de febrero de 1946, Ramón Turrientes, explicó las dificultades surgidas en la firma del Convenio calificándolas de "bastante aceptable dentro de las circunstancias en que hubo que firmarlo y siempre bajo la presión de la Ley del Seguro" (19).

El 16 de diciembre de 1946 se celebró la primera asamblea del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, acudió a ella, entre otras personalidades (20), el Inspector General de Farmacia, Nazario Díaz López (1902-1988); en su intervención recordó: "os encontráis, en el orden del día, con un problema nuevo, que es el Seguro de Enfermedad, que ha hecho que se muevan hasta los propios cimientos..." (21). Entre las conclusiones aprobadas en esa primera reunión se dedica una especial a la colaboración de los farmacéuticos con el Seguro de Enfermedad: "Estima la Asamblea que, previa la aceptación por el Instituto Nacional de Previsión de algunas bases deontológicas y económicas, se

acepte el que la clase farmacéutica preste su colaboración, organización y cuanto sea necesario a la buena marcha del servicio farmacéutico en el Seguro de Enfermedad" (22). El domingo 20 de diciembre de 1946, el presidente del Consejo, Ramón Turrientes, realizó una entrevista para Radio Nacional; al preguntarle sobre los temas tratados en la asamblea general del Consejo destacó sólo uno, el seguro de enfermedad: "El tema más importante y, como tal, el más discutido en nuestra Asamblea, ha sido el de nuestras relaciones profesionales y económicas en la tarea del Seguro de Enfermedad" (23).

El convenio firmado en 1944 entre el Instituto Nacional de Previsión y el Consejo General de Colegios fue denunciado el 18 de marzo de 1946; a finales de 1947 se inician las gestiones para la firma de un nuevo convenio (24) pero la aprobación, en enero de 1948, del reglamento de servicios sanitarios del Seguro Obligatorio de Enfermedad, en el que se regula el derecho a la atención médica especializada, volvería a modificar el panorama (25).

La nueva norma regulaba las recetas oficiales y, en el último párrafo del artículo 118, establecía que "no podrán prescribirse otras especialidades farmacéuticas que las incluidas en el Petitorio del Seguro", a la par fijaba otras limitaciones: recogía la prescripción de medicamentos sujetos a control oficial (artículo 119), limitaba las dosis que se debían prescribir en las enfermedades agudas y crónicas (artículo 120), regulaba los botiquines que debían instalarse en las localidades donde no existiera farmacia (artículo 124) y establecía que el asegurado podría solicitar la dispensación de lo prescrito en las recetas en cualquier farmacia, excepto cuando existiera en su demarcación una farmacia propia del Seguro, a la que habría de acudir necesariamente (artículo 123). De nuevo el 'fantasma' de las 'farmacias del Seguro' volvía a resurgir como argumento estatal en las negociaciones con los representantes de la profesión farmacéutica.

En esta primera organización de la prestación farmacéutica se incluye la orden del Ministerio de Trabajo, de julio de 1951, sobre sanciones que podrían imponerse a los farmacéuticos que contravengan lo dispuesto en materia del Seguro de Enfermedad (26), lo que ocasionó algunas condenas que afectaron a los profesionales de este colectivo (27).

La firma del nuevo concierto entre el Instituto Nacional de Previsión y el Consejo General de Colegios de Farmacéuticos hubo de esperar al 9 de mayo de 1953 (28); se produjo tras una limitación en la capacidad prescriptora de los médicos, producida tras la aprobación del *Petitorio...* del Seguro Obligatorio de Enfermedad (29) y de una rebaja en los márgenes de la comercialización de medicamentos. Tras la firma de este nuevo convenio, los dirigentes de la profesión farmacéutica ofrecieron una visión crítica de los diez años de puesta en práctica del seguro obligatorio de enfermedad:

"Considerando al SOE como una conquista social llena de sentimiento humano y sentimiento cristiano, esto quiere decir que nunca hemos estado en contra de él, sin que por ello tengamos que aceptar la totalidad de los procedimientos empleados para su realización. Aceptamos el principio, pero podemos estar disconformes con los procedimientos, y en muchos aspectos lo estamos (...) había que descontar, y se descontó. Había que concertar y se ha concertado. No estaba a nuestro alcance discutir la cuantía de la aportación, pero sí estaba que al convenir quedasen reconocidos aquellos principios que definen la profesión farmacéutica. Cuando hubo duda en la interpretación pedimos aclaración a quien corresponde interpretar. De aquella aclaración nace el que el farmacéutico haga el total descuento y que escalonadamente éste sea recuperado. No hacía falta una preparación tan larga, tan inapropiada y, en resumen, tan ineficaz como la que se ha hecho para llegar a un fin, porque los farmacéuticos, nosotros, ya habíamos comprendido.

Nuestro nuevo convenio nace cuando se afirma que ha terminado un periodo en el seguro de enfermedad, el de campamento, y empieza otro, el de la responsabilidad; nosotros estuvimos siempre en el de la responsabilidad, nunca estuvimos en el de campamento. No creemos que nadie haya contraído más méritos que los farmacéuticos en el seguro obligatorio de enfermedad, al que prestaron desde el principio no solo su colaboración, dándole viabilidad al poner a su servicio sus oficinas, su experiencia y su decidida inclinación a favor del servicio que se creaba, sino, además, su ayuda económica, financiando la prestación farmacéutica, que le permitió su desenvolvimiento (...) A cambio de esto, si algo vale, solo pedimos que se nos permita, en este nuevo periodo de responsabilidad, la nuestra por delante, colaborar y exigir que los demás cumplan con la suya" (30).

3. Racionalizar el gasto en medicamentos: el control de precios en la prestación farmacéutica del Seguro Obligatorio de Enfermedad

Tal como había quedado establecido, la prestación farmacéutica del seguro obligatorio de enfermedad fue efectiva desde el día primero del mes de septiembre de 1944. En una nota del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Madrid, publicada en el *Boletín de Información...* del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, se recogió el volumen de recetas tramitadas en aplicación del convenio suscrito con el Instituto Nacional de Previsión (*cf.* Tabla 1); tan solo en nueve meses se había triplicado el número de recetas y quintuplicado el importe en pesetas.

Tabla	1	Recetas	del	seguro	de	enfermedad,	У	coste	de	estas,	entregadas	al
Colegio de Farmacéuticos de Madrid [septiembre, 1944 / mayo, 1945] (31)												

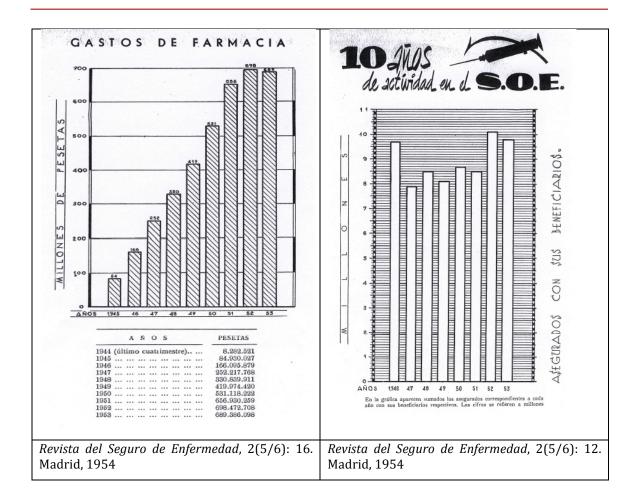
Meses	Número de recetas	Importe en pesetas
Septiembre [1944]	24.020	115.298,00
Octubre [1944]	30.760	155.008,82
Noviembre [1944]	30.516	166.173,58
Diciembre [1944]	33.720	197.544,24
Enero [1945]	41.874	255.489,26
Febrero [1945]	63.543	409.314,94
Marzo [1945]	60.803	430.029,12
Abril [1945]	67.226	516.094,68
Mayo [1945]	73.575	605.310,84

El Colegio de Farmacéuticos de Madrid exponía, en mayo de 1945, cuando la prestación farmacéutica del Seguro llevaba implantada tan solo nueve meses, las dificultades administrativas encontradas para la liquidación de las recetas; este apoyo administrativo se costeaba con las cuotas de los colegiados:

"Las liquidaciones a los Colegios de estas cantidades se han realizado desde el primer momento en los plazos señalados en el convenio, salvo algún mes, que, por no haber hecho efectivas el Colegio las facturas presentadas a su debido tiempo, hemos tenido que realizar liquidaciones parciales a los farmacéuticos. Hoy, sin embargo, está totalmente normalizado el pago (...)

No tenemos que negar que el esfuerzo realizado por nuestra sección administrativa ha sido enorme, ya que el movimiento de cuentas que las cantidades antes reseñadas llevan consigo, puede calcularse con el solo dato de que en la provincia de Madrid funcionan 111 Sociedades colaboradoras y existen abiertas 560 farmacias" (32).

En estos primeros años del seguro de enfermedad, el gasto en medicamentos se fue incrementando de forma muy notable: en el año 1945 ascendió a 84.930.027 pesetas y, al siguiente, en 1946, alcanzó la cifra de 166.095.879 pesetas, que representaba un 95,6% de incremento interanual, cuando aún no se habían puesto en marcha las especialidades médicas; en 1953 el gasto ascendió a 689.386.098 pesetas, lo que representó un aumento del 811,71%. El incremento de beneficiarios no se produjo al mismo ritmo, por lo que los ingresos del Seguro no crecían de forma similar a los gastos; el incremento de la prima, de un 6,35% a un 8%, en el año 1948, se efectuó para compensar las desviaciones (33).



Esta evolución ascendente del gasto en medicamentos, ligada a una repercusión positiva en la salud de los asegurados y a una evolución, también ascendente, de los ingresos de la industria farmacéutica y de las farmacias, fue expuesta por el ministro José Antonio Girón en un discurso pronunciado en las Cortes durante el verano del año 1950:

"Hasta aquel momento, las clases económicamente débiles no consumían medicamentos. Cuando más, alguna receta magistral, la clásica receta que apenas tenía volumen económico. De pronto una demanda fabulosa y repentina hizo elevar el consumo de medicamentos de tal modo, que en un gráfico habría que figurarlo con una vertical altísima. Los beneficiarios del Seguro no tenían capacidad económica para adquirir medicamentos de un coste que se llevaba en cualquier caso el importe de un jornal o de varios jornales (...) la ruptura de la compuerta produjo la inundación y el susto. Alguien llegó a temer, y con cierto fundamento, que semejante riada iba a dar al traste con el Seguro de Enfermedad en pocos meses (...).

El gasto ha sufrido un considerable aumento con la aparición de drogas nuevas, por lo general de una eficacia portentosa, que no hubiera sido decente, ni moral, ni honrado, negarle al trabajador o escamotearle su uso (...) se observó este fenómeno con la aparición de las sulfamidas; posteriormente, con la de los antibióticos, y en la actualidad, con otras drogas de eficacia verdaderamente notable, pero cuyo precio, muy elevado, repercute, en efecto, en la economía del seguro (...) (34)

Me interesa hacer constar, para mayor claridad en la comprensión del problema general de la prestación farmacéutica, y sencillamente por pura información de los señores procuradores, que el seguro obligatorio de enfermedad ha dejado a la industria química y a las farmacias españolas un beneficio, en cinco años, de pesetas 553.966.689,73. Este beneficio se obtiene de aplicar el 15 por cien para la industria químico-farmacéutica, el 12 por 100 para el almacenista y el 25 por 100 para las farmacias, sobre los 1.261 millones largos que importa el suministro durante cinco años, que, como son detracciones sucesivas, representa el 43,9 por 100 de la cantidad total (...) quiero aclarar a este respecto que el 12 por 100 del almacenista y el 25 por 100 de beneficio que el farmacéutico obtiene son beneficios brutos -no ocurre lo mismo con el 15 por cien del preparador, que es líquido- y que de ellos tiene que deducir los gastos generales, que no son pequeños..." (35)

Aunque el discurso de José Antonio Girón parecía una mera relación de cifras fácilmente comprensibles, tenía un fin muy meditado: por un lado, informaba sobre el 'ajustado' equilibrio económico del Seguro dejando ver que la propuesta de incremento de márgenes de algún sector daría lugar al desequilibrio y, por otro lado, recordaba que el Seguro podía disponer de farmacias y laboratorios propios; se trataba de una clara advertencia a ambos sectores, especialmente a los farmacéuticos, utilizando un lenguaje acorde con el Régimen:

"Cualquiera de vosotros que tenga una ligera experiencia comercial sabe que, partiendo de un 25 por 100 de beneficio bruto, no quedan grandes márgenes de utilidades, y hasta pueden resultar cifras catastróficas si se tiene en cuenta el enorme riesgo que caracteriza a estos negocios. ¿Qué remedio cabría aplicar? Entre elevar los costes de los productos para poder garantizar a los farmacéuticos una utilidad que hoy parece que no tienen, con lo cual agravaríamos la situación financiera del Seguro y condenar a una benemérita clase a prestar un servicio tan voluminoso sin compensación que valga la pena, ¿no cabría una solución intermedia?, ¿no cabría que el Seguro dispusiera de laboratorios propios y de farmacias propias en los que bastaría con cubrir los gastos? Esta solución no perjudicaría a nadie, puesto que antes de la existencia del Seguro existía la industria químicofarmacéutica y la carrera farmacéutica, sin que a causa del Seguro se hayan hecho nuevas instalaciones apreciables, que, en caso de existir, serían absorbidas por el Seguro. Tal vez algún día vosotros, señores procuradores, tendréis que considerar este problema y resolverlo. Ese día, si vosotros consideráis necesario que llegue, será el día de la liberación económica de esas clases beneméritas, a las que hemos abrumado con una obligación dura de llevar durante los años primeros del Seguro, que gracias a ella ha podido ponerse en marcha, por lo que a la prestación farmacéutica se refiere. Ese será el día también de agradecerles públicamente, al mismo tiempo, sus grandes servicios, que no pueden seguir pesando sobre su martirizada economía..." (36)

La contestación del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos a las palabras del ministro Girón se centró en trasladar la responsabilidad de alcanzar un acuerdo a los organismos técnicos, pues entendía que el problema tenía una solución económica, no podría basarse en otro tipo de planteamiento:

"Es natural que el problema no puede ventilarse ni en un discurso ni en unos comentarios; serán organismos técnicos al servicio del Señor Ministro los que, no olvidando el fin social que se persigue y con la colaboración de los sanitarios españoles, le puedan asesorar para que sus determinaciones encierren el mayor acierto posible en la solución de la mayoría de los múltiples aspectos de este problema de tan extraordinario interés para los asegurados y para la propia patria española..." (37)

Se hace difícil no vincular este discurso de Girón con la promulgación, apenas unos días después, del decreto de 21 de julio de 1950 por el que se crea la Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad en la Dirección General de Previsión (Ministerio de Trabajo) (38); en pocos meses esta Jefatura se haría cargo de la elaboración del, tantas veces invocado, *Petitorio...* oficial del Seguro para la prestación farmacéutica y seleccionaría los medicamentos y laboratorios suministradores (39); el nuevo servicio quedó bajo la dirección del magistrado Ramón Díaz Fanjul (m. 2004) (40).

En apenas un año se confeccionó el primer *Petitorio...* oficial del seguro de enfermedad, su acta queda firmada el 29 de noviembre de 1951 (41); una vez publicado, desde la Dirección General de Previsión se aprobaron las bases del concurso para la provisión de los medicamentos que habían de figurar en él (42). El Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España recordará, años más tarde, que no fue posible alcanzar un acuerdo previo respecto a las condiciones contenidas en el concurso de suministro de medicamentos, recordando, a su vez, que tampoco se alcanzó ese acuerdo previo en el primer convenio celebrado entre el Consejo y el Instituto Nacional de Previsión, para la prestación farmacéutica (43).

La limitación en la prestación farmacéutica que suponía el *Petitorio...* fue vista con recelo por el gabinete de Girón de Velasco (44); en marzo de 1952, en el diario *Las Provincias* de Valencia, Fernando Coca de la Piñera (n. 1910), quien a la

sazón ocupaba el cargo de Director general de Previsión (45), señalaba el elevado gasto en medicamentos que suponía la prestación ofertada por el seguro de enfermedad y proponía algunas soluciones:

- "- Como última cuestión, ¿quiere decirnos cuál es hoy la mayor dificultad con que se enfrenta el Seguro de Enfermedad?
- Sin duda alguna el elevado coste de los medicamentos, que supone un gasto diario de dos millones de pesetas.
 - ¿Han pensado cómo solucionar tan grave problema?
- El Seguro de Enfermedad es el mejor cliente de la industria farmacéutica española. Pretendemos huir de una intromisión en esferas propias de la actividad privada, pero creemos tener derecho a que por aplicación de las normas comerciales usuales en la actividad privada, se nos dé el trato debido al mejor cliente" (46).

En términos similares se pronunció Ramón Díaz Fanjul, Jefe Nacional del Seguro, al detallar, en abril de 1952, las razones que dieron lugar a la redacción del *Petitorio...*:

"Por una parte existe el peligro del abuso de los modernos y activos productos químicos y biológicos, y de otra, que la administración de los medicamentos sin precisión ni rigor determina numerosas contraindicaciones, incompatibilidades y sensibilizaciones ya de todos conocidas.

Pero no es menos importante el aspecto social del problema; la falta de cultura en las gentes, o aun la ausencia de sentido ético, crea, en ocasiones, esas reacciones individuales que originan agudos choques entre médicos y asegurados" (47).

Tras algunas notas de prensa como a las que nos hemos referido líneas arriba, y que alcanzaron a los diarios nacionales (48), desde el gabinete de Girón se optó por trasladar la responsabilidad de limitar la prestación farmacéutica a los propios cotizantes. Una orden del Ministerio de Trabajo, de fecha de 28 de abril de 1953 (49), dispuso una consulta pública sobre el sistema de prescripción farmacéutica que los asegurados preferían; los motivos de la consulta se detallan en el preámbulo de la norma:

"El aumento progresivo del precio de las especialidades farmacéuticas desde la implantación del Seguro Obligatorio tiene una evidente repercusión económica en el mismo. Los avances constantes de la Medicina con la aparición de los antibióticos y nuevas drogas, surgidos con posterioridad al año 1945, han creado una situación fundamentalmente distinta en cuanto a la terapéutica.

El Seguro está dispuesto a proporcionar a sus beneficiarios, sin participación económica directa de éstos y sin aumento de la prima, toda la terapéutica eficaz para una óptima asistencia, facilitando los antibióticos y nuevas drogas (penicilina, estreptomicina, cloromicetina, aureomicina, tirotricina, terramicina, hidracida del ácido isonicotínico, etc.), pero reduciéndolos, como es natural, a aquellas enfermedades en que estén clínicamente indicados y en las dosis pertinentes, con la supresión de aquellas especialidades farmacéuticas que por su composición o vía de aplicación son de escasa o nula acción terapéutica o fácilmente sustituibles por fórmulas magistrales.

No obstante, los Órganos Gestores del Seguro y este Departamento ministerial desean conocer de una manera directa el punto de vista de los asegurados sobre las cuestiones que se dejan enunciadas..." (50)

Las dos opciones que planteaba la consulta, para cuya realización se fijaron los días comprendidos entre el 15 y el 30 de mayo de este 1953, eran:

"SÍ. / Estoy conforme con la propuesta del Seguro Obligatorio de Enfermedad para modificar la prestación farmacéutica, que en lo sucesivo se ajustará, además de la dispensación general de fórmulas magistrales, a las normas del Petitorio elaborado por la Comisión Mixta del Ministerio de Trabajo, que contiene los medicamentos y productos farmacéuticos, incluidos antibióticos, fundamentales para asegurar un tratamiento eficaz con arreglo a la terapéutica actual..."

"NO / Estoy conforme con la modificación de la prestación farmacéutica que propone el Seguro Obligatorio de Enfermedad y quiero continuar con el régimen actual..." (51)

De la lectura de las dos opciones, no cabe duda que la votación mayoritaria se decantaría por el *Petitorio...*, pues este sería el único modo de adquirir antibióticos y otros 'medicamentos modernos', con cargo al Seguro de Enfermedad.

La prensa nacional se hizo eco de esta consulta, en las páginas de *La Vanguardia Española* publicadas el 1 de mayo de 1953, se exponía el objeto y el procedimiento de la votación, que se realizaría en las mesas expuestas en las empresas (52).

El 19 de mayo de 1953 -en pleno período de sufragio- se publicó otra nota de prensa, redactada por el gabinete de José Antonio Girón de Velasco, destinada a los trabajadores, donde se detallaban las razones que habían llevado a la elaboración de un *Petitorio...* para el Seguro. Se indicaba también que el *Petitorio...* al que hacía referencia el Ministro contenía 157 medicamentos e iba firmado por el

presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos, Antonio Crespo Álvarez (1891-1972), además de avalado con la firma de nueve facultativos:

"En algunos países el asegurado ha de pagar una cantidad por cada receta, cualquiera que sea el costo de la especialidad. En otros se modificó la prima de cotización o se impuso al asegurado el satisfacer un elevado tanto por ciento del valor del medicamento. Ni un sistema ni otro proponemos; hemos de ser consecuentes y fieles al sistema que se preconizó desde un principio, pero hay que pensar seriamente una medida de acuerdo con la realidad. No puede moverse la cuota en las circunstancias actuales (...) Tampoco queremos que el asegurado contribuya con una participación del valor del medicamento, porque el elevado coste de muchos preparados le impediría con sus ingresos, ya mermados por su situación de baja, la adquisición del remedio para su enfermedad (...) Esta preocupación condujo a los órganos del SOE a someter a la comisión mixta del Ministerio de Trabajo la necesidad de aprobar un petitorio de especialidades farmacéuticas en el que figuraran todos los medicamentos y productos fundamentales y suficientes para asegurar un tratamiento eficaz, con arreglo a la terapéutica actual, incluyendo antibióticos y excluyendo, en cambio, aquellas medicinas de escaso o nulo valor curativo (...) la comisión mixta aprobó por unanimidad dicho petitorio (...) el SOE antes de tomar tan trascendental medida, quiere saber la posición de los asegurados, y, a sus efectos, somete a su criterio y votación el régimen a seguir en el futuro" (53).

Siete días después, el 26 de mayo de 1953, aún en pleno período de consulta, se publicó en la prensa una entrevista con José Antonio Girón de Velasco, en ella justificaba la solicitud de opinión a los trabajadores al conocer que éstos no veían una intención transparente en ella:

- "- Parece, señor Ministro, que hay un cierto desasosiego con motivo de la consulta dirigida a los trabajadores acerca de los medicamentos que suministra el S.O.E. (...)
- Es posible que exista por ahí alguien, sin noción de la solvencia política y con demasiada noción de la existencia de ciertos intereses mercantiles, y que, por ambición, preste su nombre, su ligereza o su infamia para servir a beneficios propios o ajenos.

Si ese alguien existiera sería inexorablemente enjuiciado, después de ser implacablemente descubierto y expuesto a la luz pública..." (54).

Al leer alguna de las respuestas de José Antonio Girón en esa entrevista se puede entender el 'desasosiego' de los trabajadores:

- "- Pero, ¿no se les da a elegir entre unos medicamentos u otros?
- No. Se les pregunta solamente si quieren recibir todos los necesarios a cambio de no recibir los superfluos" (55).

El resultado de la consulta fue el esperado por sus promotores, según se recogió en la prensa nacional tras proceder al escrutinio de la votación:

"El resultado de la valoración fue abrumador: los trabajadores españoles votaron por el Petitorio.

Estamos seguros de que la clase médica votará también, en la intimidad de su conciencia, en el mismo sentido que los productores.

He aquí una invocación general a la reflexión, en materia de vital interés para las clases modestas, daba como resultado una afirmación juiciosa, de austeridad y de eficacia (...) Acaso en el seno de muchas familias, la superstición ante el nombre mágico de muchos jarabes, colirios prestigiosos y enormes panaceas llorase aquella libertad perdida. La clase trabajadora, en conjunto, votó por lo mejor. Y lo mejor sin duda alguna, era afrontar un problema que suponía, nada menos, atreverse a definir qué medicamentos valen la pena del sacrificio económico que al productor, al empresario y al país entero le cuesta el Seguro; y que otros medicamentos no se reputan eficaces en grado suficiente (...) Era, bien se comprende, situarse, al fin, ante una industria delicadísima, que teóricamente recoge el fruto de la investigación al servicio de la salud humana. Una industria que ha de desenvolverse necesariamente en un régimen de libertad de creación y de libertad de ofrecimiento a su eventual clientela. Incluso de respeto a su riesgo económico, y a la caducidad de muchas de sus fórmulas e inversiones. Pero, por el carácter sagrado de su fin, también una industria que, ante la salud del pueblo, debe ver proscrito todo artificio, banal, todo derroche estéril, todo recurso meramente apuntado a la imaginación del que sufre.

El problema es siempre el mismo en estos grandes casos de enjuiciamiento: ¿Quién puede decidir en las condiciones de máxima imparcialidad?. Lógicamente la eficacia de una especialidad farmacéutica solo pueden afirmarla o negarla las autoridades en la materia. El Seguro de Enfermedad ha redactado un Petitorio, bajo el criterio de una Comisión de personalidades que con pleno rigor científico juzgan la eficacia curativa de cada producto y sus merecimientos para formar parte de la extensa relación que el petitorio comprende. Figuran en ella las especialidades más modernas, las más caras, incluso aquellas que necesitan condiciones para ser recetadas.

Por lo demás, contando siempre con la posibilidad que el médico del Seguro tiene para recetar todas las fórmulas magistrales que un farmacéutico puede preparar, el Petitorio es, además, revisable, y de hecho se está revisando constantemente..." (56).

Quizás se deba a este 'temor político' del gabinete del ministro Girón el retraso con que el *Petitorio...* entró en vigor; aunque aprobado en 1951, no fue implantado hasta el 1 de enero de 1954 (57). Tras el refrendo público de los asegurados, no hubo problema en la imposición definitiva del *Petitorio...*; este fue remitido, por la Jefatura Nacional del Seguro Obligatorio de Enfermedad (Dirección General de Previsión), al Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos en los comienzos del diciembre de 1953 (58).

Con anterioridad, y antes de que entrara en vigor el *Petitorio...*, el 9 de mayo de 1953 (59), se suscribió un nuevo concierto entre el Instituto Nacional de Previsión y el Consejo General de Colegios de Farmacéuticos, donde se incluían los nuevos descuentos a aplicar sobre el precio de los medicamentos (60). Una vez suscrito el concierto, se remitieron instrucciones a los farmacéuticos para la aplicación del *Petitorio...*, mediante una circular del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, de diciembre de 1953 (61), complementada, pocos días después, a través de una nueva circular (62).

Una vez implantado el *Petitorio...*, entre los días 15 al 24 de febrero de 1954, el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos se reunió en sesión plenaria para tratar detenidamente la situación de la profesión ante el Seguro Obligatorio de Enfermedad. Los farmacéuticos que formaban parte de la comisión mixta central del convenio informaron al Consejo de los asuntos tratados: medicamentos que se prescriben en fracción del envase original; medicamentos en envases clínicos; período de devolución de recetas anteriores a la entrada en vigor del nuevo convenio y condiciones que debían reunir las recetas para que les fueran aplicables los descuentos que determinaba el nuevo convenio. Igualmente, se informó al pleno de la intensa labor que se había realizado para la modificación de la tarifa de fórmulas magistrales del Seguro, y muy especialmente, lo relacionado con los honorarios profesionales; aunque las mejoras conseguidas eran muy discretas, se consideraron aceptables (63).

El apoyo de los farmacéuticos a los trabajos de puesta en práctica del seguro obligatorio de enfermedad fue públicamente reconocido por Francisco Franco en la audiencia concedida, el 24 de febrero de 1954, a los representantes de Consejo General del Colegios Oficiales de Farmacéuticos, quienes le recordaron sus demandas:

"La implantación del SOE (...) no era labor fácil y sencilla adoptar los antiguos usos a esa nueva modalidad, los Colegios de toda España se han

esforzado sin embargo, por establecer la organización necesaria para que el Seguro se cumpliera con la máxima garantía de eficiencia y honestidad en su aspecto farmacéutico, labor ésta erizada de dificultades económicas y de organización que los Colegios han sabido vencer en la primera etapa de su implantación. Las nuevas disposiciones (ordenes del Mº de la Gobernación de febrero del pasado año [1953]) que regulan también las nuevas condiciones económicas con que los farmacéuticos han de prestar el servicio al SOE han venido a plantear nuevas dificultades, que este Consejo y los Colegios de toda España esperan vencer con la ayuda y el espíritu de justicia de vuestro Gobierno. Nosotros, aun con las lamentaciones lógicas y naturales de todos los sectores de la profesión por lo que a su economía afectaba, conscientes de nuestra responsabilidad y en virtud de lo legislado por el Gobierno, intentamos, como lo conseguimos, llevar a la práctica la firma del nuevo Convenio con el INP, en cumplimiento de lo dispuesto, afrontando todo género de dudas y críticas, poniéndolo seguidamente en marcha. Firmado este Convenio con el SOE, solicitamos de V.E., el 8 de julio de 1953 una audiencia, que hemos reiterado en petición de 12 de los corrientes, para en ella, suplicarle:

Nos atrevemos, con el mayor respeto, a insinuar que todos los quebrantos aludidos, no son fáciles de acoplar y creemos prácticamente imposibles de superar, pero consideramos más penoso todavía el estado de intranquilidad y desasosiego en que esta situación de desequilibrio obliga a vivir a mas de 1.300 laboratorios, 400 entidades mayoristas y 8.500 farmacéuticos con oficina de farmacia, muchos de los cuales, precisamente los más modestos y repartidos por todo el ámbito nacional, podrían no tener la satisfacción que sus padres, en una gran parte, tuvieron de poder ver a sus hijos farmacéuticos..." (64).

En este mismo año de 1954, el 28 de junio, se constituyó el Consejo Nacional del Seguro Obligatorio de Enfermedad; una de sus primeras actuaciones fue la revisión del contenido del *Petitorio...* (65). Una vez estudiado, en su reunión del 6 de diciembre de 1954, este Consejo Nacional aprobaba su revisión (66). Con fecha de 21 de diciembre de 1954, la Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad remitió una invitación a los laboratorios farmacéuticos para que presentaran, ante las dependencias del Seguro Obligatorio de Enfermedad, los medicamentos de su fabricación que deseaban que formaran parte del nuevo *Catálogo de especialidades farmacéuticas incluidas en el petitorio...*, el límite para su presentación en la Jefatura Nacional era del 1 de febrero de 1955 (67).

El 5 de marzo de 1955 la Jefatura Nacional del Seguro se dirigió al Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos para que este informara a todos los Colegios de que estaba en trámite la determinación de las 'especialidades' del Petitorio... (68). El editorial de la Revista del Seguro de Enfermedad de junio de 1955 se dedicó a defender el Petitorio... y su revisión con una argumentación muy generalista, indicando que con él se pretendía facilitar al médico la labor de elección del medicamento ante la "superabundancia de especialidades"; el editorial 'culpaba' de la restricción en la libertad de prescripción a la falta de una ordenación comercial de los medicamentos, manteniendo que sí existía una organización sanitaria rigurosa (69); teniendo en cuenta las posibles críticas sobre intereses distintos de los asistenciales, afirmaba: "No hay otros legítimos intereses sino los de una eficaz asistencia, una completa prestación y una aplicación de las primas en beneficio exclusivo de los asegurados" (70). Por último, insistía en que el Petitorio... revisado recogería "todo lo que es valioso en el terreno científico" para "resolver todas las necesidades terapéuticas actuales"; por tanto, ningún médico debería pensar que se trataba de mermar su libertad profesional por intereses distintos a los estrictamente asistenciales:

"Queremos únicamente agregar que el deseo del Seguro de Enfermedad es que sus médicos sientan garantizada su libertad profesional a la hora de prescribir al enfermo al tratamiento adecuado y preciso. De eso se trata: de que la asistencia sea la adecuada; de que el asegurado tenga para su curación todo cuanto necesite, pero también únicamente aquello que en conciencia necesite. Ni mas, ni menos" (71).

El 21 de junio de 1955 se publicó un anuncio del Seguro de Enfermedad, destinado a los laboratorios farmacéuticos, invitándoles a asistir a la sede de la Jefatura Nacional del Seguro Obligatorio de Enfermedad, para que pudieran informarse de los medicamentos admitidos en el *Catálogo*... y, a la vez, se les daba una nueva oportunidad de solicitar la inclusión de nuevos productos "que hubiese sido registrada con posterioridad a las presentadas" (72).

La tozuda realidad de los datos muestra que, pese a las limitaciones impuestas a la prescripción por el *Petitorio*..., el gasto en medicamentos a cargo de la prestación del seguro de enfermedad siguió su línea ascendente, en gran parte motivado por el aumento en el número de recetas dispensadas (*cf.* Tabla 2).

Tabla 2.- Número de asegurados, de beneficiarios, de recetas dispensadas con cargo al Seguro Obligatorio de Enfermedad y gasto promedio de farmacia por persona de protección anual [1944/1955] (73)

Años	Asegurados	Asegurados y beneficiarios	Recetas dispensadas	Gasto promedio [pesetas]	
1944	2.143.672	8.972.617		0,92	
1945	2.521.866	9.835.370		8,64	
1946	2.749.089	10.447.633		15,90	
1947	3.034.107	11.354.611		22,21	
1948	3.166.296	11.712.747		28,25	
1949	3.131.501	11.511.354		36,48	
1950	3.064.641	11.245.278	32.104.000	47,23	
1951	3.162.444	11.599.942	35.182.000	56,63	
1952	3.297.288	12.063.823	39.679.000	57,88	
1953	3.719.362	12.427.116	43.210.000	55,48	
1954	3.621.110	12.620.689	45.471.000	58,27	
1955	3.784.376	13.165.127	49.752.000	66,67	

El médico Alejandro Gasca (74), defendió, en julio de 1955, desde las páginas de la *Revista del Seguro de Enfermedad*, la conveniencia de adoptar el *Petitorio...* como mecanismo para reducir el gasto en medicamentos y, además, proponía gravar las recetas con un tanto por ciento a cargo del beneficiario, incrementar el control sobre las recetas expedidas por los médicos de medicina general y aumentar la prescripción de fórmulas magistrales, aunque con argumentos particulares y sin aportar estudios objetivos que los justificaran (75).

4. Corolario

La realidad fue que, pese a todas las medidas tomadas, el Instituto Nacional de Previsión siempre mantuvo viva la posibilidad de establecer sus propios laboratorios, almacenes y farmacias. En octubre de 1958 realizó un estudio técnico, rubricado por el equipo del Subdelegado general de Seguros del Instituto Nacional de Previsión, Enrique Serrano Guirado (1920-1967); entre las conclusiones para reducir el gasto en medicamentos, este estudio recogió dos propuestas bajo el título 'la socialización de la farmacia', donde proponía la apertura de farmacias propias del Seguro atendidas por un cuerpo propio de profesionales farmacéuticos especialistas, y la fabricación de la mayoría de los medicamentos del *Petitorio*... por el propio Seguro (76).

En los primeros meses de 1961, la prensa periódica comienza a hacerse eco de una propuesta de libertad de prescripción de medicamentos, con la participación de los beneficiarios en su costo (77). En enero de 1967 dejó de estar vigente el *Petitorio...*; el 23 de diciembre de 1966 se publicó el Decreto 3157/1966

(78), por el que se regulaba la dispensación de 'especialidades farmacéuticas' en el régimen general de la seguridad social; en él se establece la supresión del *Petitorio...* y del *Catálogo de especialidades farmacéuticas incluidas en el petitorio...* a la par que se especificó la participación de los beneficiarios en el pago del precio de los medicamentos; previamente, el texto articulado de la ley de bases de la seguridad social, aprobado el 21 de abril de 1966 (79), tras establecer la libertad de prescripción en materia farmacéutica, preveía ya aquellos casos en que los beneficiarios del SOE habrían de participar en el pago del precio de los medicamentos.

5. Referencias

- 1. Sobre la implantación del seguro obligatorio de enfermedad durante el franquismo, cf. García Padilla, M. (1990). Historia de la acción social: seguridad social y asistencia (1939-1975). En: Historia de la acción social pública en España: beneficencia y previsión. Madrid, Ministerio de Trabajo v Seguridad Social, p. 397-448; Rodríguez Ocaña, E. (2002). Los servicios de salud pública en la España Contemporánea. Trabajo social y salud, 43 [La acción social de la medicina y la construcción del sistema sanitario en la España contemporánea], p. 91-118; González Murillo, P. (2005). La política social del franquismo: el Seguro Obligatorio de Enfermedad. Aportes: Revista de Historia Contemporánea, 20(57) [El ecuador del Régimen de Franco: los años cincuenta], p. 65-76; Serrallonga i Urquidi, J. (2007). El cuento de la regularización sanitaria y asistencial en el régimen franquista: una primera etapa convulsa, 1936-1944. Historia social, 59, p. 77-98; Álvarez Rosete, A. (2009). Elaborados con calma, ejecutados con prisa. El avance de los seguros sociales y la evolución del Instituto Nacional de Previsión en España entre 1836 y 1950. En: S. Castillo, R. Ruzafa (coord.) La previsión social en la historia. Madrid, Siglo XXI, p. 101-135; Pons Pons, J. (2010). Los inicios del seguro de enfermedad en España, 1923-1945. En: J. Pons Pons, J. Silvestre Rodríguez (coord.). Los orígenes del estado de bienestar en España, 1900-1945: los seguros de accidente, vejez, desempleo y enfermedad. Zaragoza, Prensas Universitarias de Zaragoza, p. 217-246; Pons Pons, J. (2010). El seguro obligatorio de enfermedad y la gestión de las entidades colaboradoras (1942-1963). Revista de la Historia de la Economía y de la Empresa, 4 [De la beneficencia al estado de bienestar, pasando por los seguros sociales], p. 227-248; Vilar-Rodríguez, M., J. Pons-Pons (2012). The introduction of sickness insurance in Spain in the first decades of the Franco dictatorship (1939-1962). Social History of Medicine, 26, p. 267-287.
- 2. El ministro Francisco Largo Caballero encargará al Instituto Nacional de Previsión, en la primavera de 1932 (*Gaceta de Madrid*, 10-V-1932), la preparación de un proyecto de régimen de seguro de enfermedad, sobre la base de los convenios ratificados por las Cortes el 5 de abril de ese año 1932. El 28 de mayo de 1936 se publicó en la *Gaceta de Madrid*, la orden de Joan Lluhí Vallescá, de 25 de mayo, donde se contenía el proyecto para la unificación de los seguros sociales y se abría un plazo de información pública, por término de veinte días naturales, a fin de que se formulasen observaciones a la norma; el plazo comenzaba el día siguiente al de la publicación, por lo que habría de terminar el 17 de junio de 1936. La insurrección militar de 1936 suspendió la tramitación de la ley.
- 3. "Bases para la preparación de un proyecto de Ley sobre los seguros sociales unificados y coordinados" (Archivo histórico del Instituto Nacional de Previsión (INGESA): 23/1976. C-4/23-B3-C3, leg. 49.1: "Ley del Seguro de Enfermedad. Comisión para redactar el Anteproyecto de Ley. Comentarios a la Ley del S.E. [Seguro de Enfermedad]").
- 4. El 'Fuero del Trabajo' fue proclamado el 9 de marzo de 1938 (BOE 10-III-1938), inspirado en la 'Carta de Trabajo' italiana, alcanzó -una vez finalizada la guerra civil- el rango de ley fundamental del nuevo Régimen; en sus Declaraciones III y X se encargaba a la nueva Administración la implantación del subsidio familiar y el incremento de los seguros sociales, que tendrían como fin amparar al trabajador en una situación de infortunio. Sobre la trascendía asignada a los preceptos del 'Fuero del Trabajo' en los trabajos del seguro obligatorio de enfermedad se pronuncia el propio Instituto Nacional de Previsión en 1946: "... la tarea del Instituto [con anterioridad a 1936] fue estéril (...) El Fuero del Trabajo (...) en él se acogen y

- amparan todas las ansias legítimas de mejora social, de justicia social, y, naturalmente, se recoge el anhelo que de antiguo se había puesto en el Seguro de Enfermedad y su pronta implantación..." [Instituto Nacional de Previsión] (1946). El Seguro de Enfermedad. [Hojas divulgadoras del Instituto Nacional de Previsión, 45]. Madrid, E. Giménez.
- 5. El 27 de marzo de 1942, en presencia del general Franco, en la sala Maluquer del Instituto Nacional de Previsión, el ministro José Antonio Girón de Velasco pronunció un discurso en el que detallaba la normativa aprobada por el Gobierno de Franco respecto a la previsión social. En este acto estaban presentes los miembros del Gobierno (Ramón Serrano Suñer, Valentín Galarza, José Luis Arrese, José Ibáñez Martín, Esteban Bilbao, etc.) y otros representantes de las mas altas instituciones civiles, militares y eclesiásticas (Felipe Clemente de Diego, Francisco Gómez Jordana, José Moscardó, José Millán Astray, Leopoldo Eijo y Garay, etc.), propagando así la prioridad que el 'Nuevo Régimen' daba a lo social, "su mano tendida al obrero", que recogiera la crónica del acto en la prensa nacional (La Vanguardia Española, 28-III-1942, p. 1; ABC [Madrid], 28-III-1942, p. 1). José Antonio Girón de Velasco recordó que la previsión social estaba unida a los principios y objetivos de la Falange: "No entendemos el Consejo del Instituto Nacional de Previsión (...) como reunión de señores funcionarios, sino como formación de camaradas falangistas (...) debemos ir, en esta etapa, a hacer del Instituto el mejor tentáculo del Estado Nacional-sindicalista en la política social. El espíritu del Movimiento debe presidir necesariamente, su obra, y en todas aquellas esferas de contacto con los organismos de la Falange (...) Y a todos los incrédulos y a todos los sistemáticos detractores de lo nuestro brindamos una ocasión de comprobar cómo puede funcionar un organismo de la Falange cuando tiene un pilar económico seguro en que apoyar su actividad". [José Antonio Girón De Velasco] (1942). Discurso del Ministro de Trabajo. Boletín de Información - Instituto Nacional de Previsión, 2(3), p. 5-8 (cf. págs. 5-7). Sobre la utilización de los seguros sociales como política de 'legitimación social' durante el franquismo cf. González Murillo (2005). Op. cit. nota 1 y Molinero, C. (2005). La captación de las masas. Política social y propaganda en el régimen franquista. Madrid, Cátedra.
- 6. "El Instituto Nacional de Previsión concertará, con el Consejo general de los Colegios Farmacéuticos, un Convenio en el que se garantice el buen servicio por todas las farmacias, con una tarifa reducida, especial para el Seguro. Si no se llegara a un acuerdo en el plazo de dos meses, a partir del comienzo del Seguro, el Instituto Nacional de Previsión podrá establecer farmacias propias, y el Ministerio de Trabajo, oyendo a la Dirección General de Sanidad y a la Entidad aseguradora, fijará la tarifa obligatoria para las localidades en que no las haya" (artículo 32 de la ley de 14-XII-1942, por la que se implanta el seguro de enfermedad. BOE 27-XII-1942).
- 7. Atendiendo a ello se publicó la orden de 17 de noviembre de 1943 (BOE 21-XI-1943) de la Presidencia del Gobierno, donde se estableció el plazo máximo de un año para que todos los laboratorios de 'especialidades farmacéuticas' presentasen en la Dirección General de Sanidad un estudio económico para cada especialidad o producto (tanto para las 'especialidades' que tuvieran ya fijado un precio con anterioridad a la publicación de esta orden, como para las de nueva fabricación), con el fin de obtener la correspondiente autorización del precio de venta.
- 8. El 5 de octubre de 1944 Presidencia del Gobierno hace pública una orden (BOE 8-X-1944) mediante la que se ajustan las competencias de la Dirección General de Sanidad (Ministerio de la Gobernación) y de la Secretaría General Técnica del Ministerio de Industria y Comercio, en ella se daba prioridad a las decisiones de la Dirección General de Sanidad; sería esta la que fijaría el precio de algunos productos (vacunas, hormonas, vitaminas etc.), por delegación de la Junta Superior de Precios y sin la participación en el procedimiento del Ministerio de Industria y Comercio; para el resto de productos era la Dirección General de Sanidad y la Secretaría General Técnica del Ministerio de Industria y Comercio, de mutuo acuerdo, quienes debían establecer el régimen de revisión y fijación del precio de las 'especialidades farmacéuticas' no incluidas en dicha lista; se modificaba con ella el contenido de una disposición anterior, la orden de 17 de noviembre de 1943 (BOE 21-XI-1943), en detrimento de las competencias del Ministerio de Industria y Comercio. Consciente de su nuevo protagonismo, el Ministerio de la Gobernación hace pública, tres meses después, el 11 de enero de 1945, una orden dictando normas para la fijación de precios de las 'especialidades farmacéuticas' (BOE 15-I-1945); en ella se determinaba el beneficio del fabricante ['beneficio profesional'], el beneficio del almacén ['margen de utilidad a percibir por el almacenista'] y el beneficio de la farmacia ['margen de utilidad a percibir por el farmacéutico'], establecido en un 25% sobre el precio de venta al público; esta disposición,

además, regulaba, de forma provisional, en tanto se aprobaban los reglamentos de desarrollo de la ley general de sanidad, la reapertura, en la Inspección General de Farmacia (dependiente de la Dirección General de Sanidad), de los registros farmacéuticos para la inscripción de medicamentos y laboratorios que habían sido suspendidos por orden ministerial de 20-VII-1944 (BOE 30-VII-1944) para dedicarse, desde entonces, a efectuar la labor de revisión de precios. Posteriormente sería modificada por orden de Gobernación de 10 de mayo de 1948 (BOE 23-V-1948) donde se establecía, para la dispensación, un margen del 30% sobre el precio de venta al público, exceptuado los timbres y teniendo en cuenta que, en las especialidades suministradas al Seguro se hará un descuento del 6,66%, consignándolo así en las facturas presentadas por los Colegios profesionales al Seguro Obligatorio de Enfermedad; este descuento del 6,66% se incrementó a un 18%, mediante la orden de 13 de febrero de 1953: 5% sobre las farmacias, 3% sobre el almacén y 10% sobre los laboratorios (BOE 8-III-1953); simultáneamente, mediante otra orden ministerial de la misma fecha, 13 de febrero de 1953 (BOE 8-III-1953), se establecía un sistema de descuentos específicos para los antibióticos: un 8%, debido a que eran los responsables del mayor porcentaje del gasto de medicamentos en el Seguro, aportados solo a cargo de las farmacias (5%) y de los almacenistas (3%); la especificidad de descuento para los antibióticos se justificaba en que estaban sometidos a un régimen especial para la fijación de su precio y a que, en definitiva, suponían la mayor aportación para las arcas del SOE. A fines de 1947, mediante orden del Ministerio de la Gobernación, de 29 noviembre de 1947 (BOE 4-XII-1947), se había constituido una Junta para ordenar los precios de las 'especialidades farmacéuticas': estas serían estudiadas e informadas por una comisión constituida en la Dirección General de Sanidad, presidida por el Director general de Sanidad y de la que formarían parte el Inspector general de Farmacia, el Subdirector médico de la Caja Nacional del Seguro de Enfermedad, un representante del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, un representante del Consejo General de Colegios Oficiales Médicos, un representante de los laboratorios preparadores de 'especialidades farmacéuticas' y el jefe de sección de registros farmacéuticos de la Inspección General de Farmacia.

- 9. Orden de 8 de marzo de 1944, del Ministerio de Trabajo, por la que se dictan normas para la ejecución del decreto de 2 de marzo sobre concierto con el Seguro Obligatorio de Enfermedad (BOE 19-III-1944).
- 10. Orden de 8 de mayo de 1944, del Ministerio de Trabajo, por la que se autoriza al Consejo General de Colegios Farmacéuticos para que dicte las normas a que han de ajustarse los Colegios Provinciales de Farmacéuticos para el 'despacho' de medicamentos a las entidades concertadas (BOE 16-V-1944).
- 11. Mediante orden de 10 de mayo de 1944, del Ministerio de Trabajo, sobre aplicación del Seguro de Enfermedad (BOE 14-V-1944), se estableció la regulación de la prestación farmacéutica efectuada por las entidades colaboradoras; en ella se fija que "toda entidad que concierte con la Caja Nacional alguna prestación sanitaria, se hará cargo de los gastos de farmacia originados por la asistencia a sus asegurados y beneficiarios" (disposición 36); se regulan los medicamentos que podían prescribirse: "las prestaciones farmacéuticas se ajustarán, en lo que a medicamentos y especialidades se refiere, al petitorio formulado por la Caja como mínimo, obligándose las entidades colaboradoras a aceptar las variaciones que en el mismo se establezcan" (disposición 37); se establece la forma de adquirir medicamentos para el uso en centros sanitarios: "las Entidades colaboradoras podrán adquirir libremente tanto los específicos del petitorio como los medicamentos, de cualquier entidad suministradora, siempre que éstos sean destinados única y exclusivamente a ser utilizados por ella dentro de sus propias instalaciones" (disposición 38) y se recoge el derecho de libre elección de farmacia: "las entidades colaboradoras no podrán limitar en ningún caso las farmacias a que acudan sus beneficiarios. Éstos únicamente estarán obligados a adquirir sus medicamentos en las farmacias propias de la Caja, en aquellos sitios en que se creara, de acuerdo con lo preceptuado en el artículo 128 del Reglamento" (disposición
- 12. "Cumpliendo lo dispuesto en el art 1º de la orden de 8 de mayo de 1944, esta entidad envió un anteproyecto de normas a la Dirección General de Previsión, de conformidad con lo previsto en esa orden, que, en sus líneas generales, ha sido aprobada por dicho organismo, según comunicación recibida en este Consejo el día 12 del actual. Por consecuencia el servicio para las entidades colaboradoras del seguro, se regulará por las siguientes bases..." [Editorial] (1944).

- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 27, p. 28-32.
- 13. Médicos de la Caja Nacional: modelo E 2.701-1 azul para fórmulas magistrales y modelo E. 2.701-1 bis rosa, para 'especialidades farmacéuticas' y efectos; médicos de entidades colaboradores: modelo E. 2.701-1 EC, azul, con franja del mismo color, para fórmulas magistrales y modelo E. 2.701-1 bis EC, rosa con franja del mismo color, para 'especialidades farmacéuticas' y efectos.
- 14. [Editorial] (1944). Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 27, p. 28-32.
- 15. Orden de 27 de julio de 1944, del Ministerio de Trabajo, por la que se dispone que a partir de 1.º de septiembre del año en curso [1944], los trabajadores afiliados en el Seguro Obligatorio de Enfermedad y sus familiares beneficiarios tendrán derecho a las asistencias del mencionado Seguro (BOE 28-VII-1944). Al menos en la prensa catalana del 2 de septiembre de este 1944, se publicó un "Aviso a los farmacéuticos de la provincia", para recordar que el petitorio que se debía aplicar, en tanto se aprobaba el del seguro obligatorio de enfermedad, era el de la beneficencia general, al que se añadían las fórmulas magistrales recetadas por los facultativos (La Vanguardia Española, 2-IX-1944, p. 9). El seguro obligatorio de enfermedad fue establecido en la fecha simbólica del 18 de julio de 1944 (orden de 27 de junio de 1944, del Ministerio de Trabajo, por la que se dictan normas relativas al Seguro Obligatorio de Enfermedad. BOE 1-VII-1944); durante ese mes de julio se identificó a los afiliados, realizándose –durante el mes de agosto- la recaudación de las primas del seguro.
- 16. "Con anterioridad al día 15 del mes de junio, remitan a la Dirección de la Caja Nacional del Seguro de Enfermedad (Sagasta, número 6, Madrid), relación de la especialidad o especialidades de que se trate y en la que se haga constar los siguientes datos: nombre de la especialidad, composición, forma farmacéutica, envase o envases, determinando la capacidad de cada uno, precio de venta al público, precio de venta especial para el Seguro, teniendo en cuenta que el abastecimiento se efectuará por intermedio de las farmacias". (ABC [Sevilla], 4-VI-1944, p. 15). La Vanguardia Española se adelantaría en hacerlo público: "Con anterioridad al día 10 del mes de junio, remitan a la Dirección de la Caja Nacional del Seguro de Enfermedad (Sagasta, número 6, Madrid), relación de la especialidad o especialidades..." (La Vanguardia Española, 31-V-1944, p. 1); aunque la fecha del 10 de junio se rectifica en La Vanguardia del día 13 de junio: "se recuerda a todos los laboratorios (...) para que con anterioridad al 15 del actual remitan..." (La Vanguardia Española, 13-VI-1944, p. 13). Después se amplió el plazo en once días: "Habiendo sido prorrogado el plazo de admisión de solicitudes de los laboratorios (...) hasta el 25 del actual..." (La Vanguardia Española, 16-VI-1944, p. 14). Una nueva nota de prensa, del 17 de junio, publica otra fecha para que las propuestas de los laboratorios se presentaran en las jefaturas provinciales del Sindicato de Industrias Químicas, y no directamente en la Caja Nacional del Seguro: "En cumplimiento de lo acordado por la Dirección de la Caja Nacional del Seguro de Enfermedad, en lo relativo a la confección del petitorio de especialidades farmacéuticas, este Sindicato participa a todos los laboratorios farmacéuticos la conveniencia de presentar sus propuestas en las Jefaturas Provinciales de este Sindicato de Industrias Químicas, y se recuerda, al mismo tiempo, que éstas deben obrar en nuestro poder antes del 22 del corriente [junio], para el debido examen, ordenación y traslado al mencionado Organismo rector del Seguro..." (La Vanguardia Española, 17-VI-1944, p. 11).
- 17. En la nueva Junta, formada por quince componentes, se encontraban: Ramón Turrientes Miguel (presidente), Joaquín Zuazagoitia Azcorra (vicepresidente), José Rodríguez Silva (secretario) y Teodoro de la Fuente López (representante del Partido único) [Editorial]. (1945). Toma de posesión del Consejo General de Colegios Farmacéuticos. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 40, p. 5-11.
- 18. Y, en su discurso de despedida, Paulino Borrallo recordó que, durante su presidencia, se instauró el seguro de enfermedad y se redactaron el reglamento y el convenio de la prestación farmacéutica, ante los que actuó "de modo que siente la satisfacción del deber cumplido". A raíz de la toma de posesión oficial de la nueva Junta, se designaron los representantes del Consejo que debían formar parte de la Comisión prevista en el convenio con el Instituto Nacional de Previsión, estos fueron el presidente y el secretario: Ramón Turrientes y José Rodríguez Silva

- ([Editorial]. (1945). Información del Consejo. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 41, p. 32-34).
- 19. Ramón Turrientes dio noticia de que el Consejo había logrado restablecer las relaciones con la Caja del Seguro y lograr que se constituyera la comisión mixta entre ambas corporaciones que se establecía en el convenio suscrito; asimismo, informó que se había obtenido representación en otras comisiones que funcionaban en la misma Caja ([Editorial]. (1946). Información del Consejo. Nombramiento de Presidente de Honor del Colegio de Salamanca a nuestro Presidente Sr. Turrientes. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 44, p. 11-17).
- 20. La mesa de la asamblea estaba constituida por Ramón Turrientes de Miguel, presidente del Consejo; José Casares Gil, decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid y Lucas Torres Canal, director del Laboratorio Municipal de Madrid; todos ellos procuradores en Cortes y miembros del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos ([Editorial]. 1946. Primera Asamblea del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 53, p. 3-21).
- 21. Op. cit. ut supra, cf. p. 3-7.
- 22. El literal en la conclusión séptima de las recogidas por la asamblea (Cf. Op. cit. ut supra, p. 19).
- 23. Turrientes de Miguel, R. (1946). Charla por Radio Nacional. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 53, p. 3-21.
- 24. El Consejo informó a los farmacéuticos, mediante circular de noviembre de 1947: "Tengo el honor de poner en su conocimiento que, llevándose a efecto actualmente las necesarias conversaciones para la realización de un nuevo Convenio entre el INP y el Consejo General de Colegios de Farmacéuticos, que reglamente el suministro de medicamentos al seguro de enfermedad, es preciso que cuando éste entre en vigor se encuentren los Colegios en la mejor posición administrativa posible, procurando, por todos los medios, que no queden incidencias pendientes de clase alguna o, en su defecto, las menos posibles". ([Editorial]. (1947). Información del Consejo. Circular núm 1. Asunto: Seguro de Enfermedad. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 54, p. 9-11; cf. p. 9).
- 25. Orden de 20 de enero de 1948, del Ministerio de Trabajo, por la que se aprueba el reglamento de servicios sanitarios del seguro obligatorio de enfermedad (BB OO E 30-III-1948, 31-III-1948, 1-IV-1948).
- 26. Orden de 12 de julio de 1951, del Ministerio de Trabajo, sobre sanciones que podrán imponerse a los farmacéuticos que contravengan lo dispuesto en materia del Seguro de Enfermedad (BOE 14-VIII-1951); las sanciones, puestas de manifiesto en los controles de la actividad de los farmacéuticos en la dispensación a los asegurados, podían llegar hasta la inhabilitación definitiva. Previamente, la orden de 3 de junio de 1947 (BOE 7-VII-1947) establecía, como competencia de la inspección de servicios sanitarios del seguro de enfermedad, la propuesta de sanciones a las farmacias en los casos establecidos. El Consejo General de Colegíos Oficiales de Farmacéuticos informó a los Colegios provinciales que no estaba entre sus funciones la defensa jurídica de los farmacéuticos por faltas reconocidas en la dispensación de recetas del seguro de enfermedad, con lo que el farmacéutico, presunto infractor, quedaba desprotegido: "Entendemos que la dispensación de recetas al Seguro de Enfermedad no tienen hoy ningún secreto para los farmacéuticos españoles; sus normas son perfectamente conocidas (...) si la realidad no nos hubiera puesto frente a los hechos nos parecería peregrino -como parecerá a quien esto leyere- que haya compañeros sancionados, previo reconocimiento por su parte de la falta, que pretendan que la obligación del Colegio es defenderles. Es cierto que la misión de los Colegios es defender a sus colegiado, cuando estos se vean perseguidos o sancionados injustamente; de esto a entender que la defensa de los Colegios ha de extenderse aún en los casos que éstos delincan..." ([Editorial]. (1950). Editorial. Insistiendo. Boletín de Información -Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 80, p. 1-2; cf. p. 1).
- 27. "Por la Dirección General de Previsión han sido sancionados varios farmacéuticos de las provincias de Alicante, Valladolid, Madrid, Salamanca y Pontevedra, por haber infringido las normas establecidas para la dispensación de recetas del seguro de enfermedad, debido a no

haberse exigido la cartilla, cambiar los medicamentos prescritos por otros productos y canje a metálico por menos valor de lo solicitado. Oscilando las sanciones impuestas desde dos meses de inhabilitación a inhabilitación definitiva para el despacho de recetas al seguro de enfermedad" ([Editorial]. (1949). Información del Consejo. Seguro de Enfermedad. Boletín de Información - Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 72, p. 8-10). Sin embargo, en alguna ocasión, el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos expuso su disensión con los procedimientos empleados por el Seguro para imponer sanciones: "Desde el día 1º de julio de 1947 en que se redactó y se han venido publicando en las páginas de este boletín numerosas aclaraciones, consejos y notas reiterativas en las que se ponía de relieve un principio y un deseo: la honradez profesional, norma deontológica suprema, distribuyó una circular en la que se especificaban, de modo claro y terminante las normas a cumplir para la dispensación de recetas del seguro de enfermedad (...) sin embargo, y esto lo anotamos con justificada indignación, nuestras advertencias (...) no han servido más que de sermón en el desierto (...) recientemente hemos tenido que acusar varios golpes motivados por el incumplimiento de las normas elementales de las relaciones de la farmacia con el seguro de enfermedad. No puede esto decir que seamos partidarios de algunos de los procedimientos empleados para llegar a este convencimiento (...) El farmacéutico debe colaborar con todo entusiasmo y el espíritu de servicio que aconseja una empresa de tan nobles fines como el seguro de enfermedad, y debían estar convencidos de que al hacerlo así colaboraban en su propia profesión". ([Editorial]. (1951). Editorial. Insistiendo con urgencia. Boletín de Información - Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 89, p. 1-3).

- 28. El convenio fue suscrito por Ramón Díaz Fanjul, Director de Asistencia Sanitaria e Instalaciones del Seguro Obligatorio de Enfermedad y Ramón Turrientes de Miguel, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España; se sometió al conocimiento del Ministro de la Gobernación, que lo aprobó, en cumplimiento de la orden de 13 de febrero de 1953, del Ministerio de la Gobernación, sobre venta de 'especialidades farmacéuticas' al Seguro Obligatorio de Enfermedad (BOE 8-III-1953), en la que se conminaba a ambas corporaciones a la firma de un nuevo convenio en menos de dos meses, contados desde la publicación de esta norma.
- 29. Hasta entonces no se habían establecido serias limitaciones en la prestación farmacéutica; así lo señalaba un editorial de la propia la revista oficial del Seguro de Enfermedad: "Las prestaciones farmacéuticas se otorgaron siempre con una gran liberalidad, aparte de algunos productos considerados en vías de experimentación, y así fue ya, como hemos dicho, desde el primer momento de la puesta en marcha del Seguro" ([Editorial]. (1952). Editorial. Primer Decenio. Revista del Seguro de Enfermedad, 1(10), p. 3-4; cf. p. 4).
- 30. [Editorial]. (1953). Nuevo Convenio. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 100, p. 3-4.
- 31. Fuente: [Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid]. (1945). Información de Colegios. Seguro de Enfermedad. Boletín de Información Consejo General de Colegios de Farmacéuticos de España, 39, p. 22-23.
- 32. [Editorial]. (1945). Información de Colegios. Seguro de Enfermedad. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 39, p. 22-24.
- 33. [Editorial]. (1954). Editorial. Revista del Seguro de Enfermedad, 2(5/6), p. 11-16 (*cf.* p. 16). Margarita Vilar-Rodríguez y Jerònia Pons-Pons señalan, al analizar las causas del déficit en el Seguro Obligatorio de Enfermedad: "The most outstanding aspects, however, was the increase in pharmaceutical cost, which caused serious problems for the provision of compulsory sickness insurance in the médium term. In 1952, pharmaceutical cost were approaching 50 per cent of sickness insurance provisions both in direct insurance and in the agreements with collaborating bodies. The tremendous growth in pharmaceutical costs was due to the fact that benefits covered the full cost of medical prescriptions, and to the consumption of new medicines such as antibiotics. Furthermore, the abuse and fraud in the issuing of prescriptions further increased expenses." (Vilar-Rodríguez, Pons-Pons (2012). *Op. cit.*, nota 1, *cf.* p. 282).
- 34. No cabe duda de la alusión, directa, al coste del medicamento más demandado: la penicilina. Hacía apenas un año que se habían adjudicado a solo dos empresas, Compañía Española de Penicilina y Antibióticos (CEPA) y Antibióticos S.A., la fabricación y comercialización de este

medicamento, esta adjudicación se hizo pública el 11 de agosto de 1949 y, al día siguiente, se anunció el precio de venta de la penicilina. Precisamente, ambas fábricas se inauguraron en el mismo mes en que José Antonio Girón pronunció su discurso en las Cortes, agosto del 1950; en principio estuvieron destinadas a envasar penicilina americana, que mas adelante fabricarían en España (Redondo Rincón, G., González Bueno, A. (2013). Penicilina para la España del primer franquismo (1944-1959). En: A. González Bueno, A. Baratas Díaz (eds.). La tutela imperfecta. Biología y Farmacia en el primer franquismo. Madrid, CSIC, p. 243-296). Laboratorios propios no, pero sí laboratorios protegidos y controlados por el Régimen, con objeto de intervenir el precio de elaboración del producto; una vez fijado este, el siguiente paso era ajustar el margen de las farmacias, para ello solo tenía que 'recordar' la posibilidad contenida en la ley del Seguro de instalar farmacias propias. Empezaba, en esta fecha, la pugna del Seguro de Enfermedad por controlar los precios de la penicilina y del resto de antibióticos que, naturalmente, se extendería a todos los medicamentos incluidos en la prestación farmacéutica.

- 35. Girón de Velasco, J. A. (1950). El Farmacéutico Español es un colaborador generoso del Seguro de Enfermedad. Importante discurso del Excmo. Sr. Ministro de Trabajo en la Sesión Plenaria de las Cortes Españolas, el día 12 de julio. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 83, p. 18-22.
- 36. Girón de Velasco (1950). Op. cit. nota 35.
- 37. Girón de Velasco (1959). *Op. cit.* nota 35 (cf. p. 22).
- 38. Decreto de 21 de julio de 1950, del Ministerio de Trabajo, por el que se crea la Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad en la Dirección General de Previsión (BOE 20-VIII-1950). Sobre la reorganización que supuso el establecimiento de este Jefatura Nacional *cf.* Pons Pons, J. (2010). El Seguro Obligatorio de Enfermedad y la gestión de las entidades colaboradoras (1942-1963). Revista de la Historia de la Economía y de la Empresa, 4 [*De la beneficencia al estado de bienestar, pasando por los seguros sociales*], p. 227-248.
- 39. El *Petitorio...* se aprobaba en cumplimiento de los artículos 60 y 61 del Reglamento del Seguro Obligatorio de Enfermedad aprobado en 1943; el artículo 60 establecía. "La asistencia farmacéutica facilitará a los asegurados y beneficiarios cuantas fórmulas magistrales sean prescritas por los facultativos del Seguro y las especialidades farmacéuticas incluidas en un petitorio revisable periódicamente" y, el artículo 61: "corresponde al Seguro la formación y revisión del petitorio de especialidades farmacéuticas" (Decreto por el que se aprueba el Reglamento para la aplicación de la Ley del Seguro de Enfermedad. BOE 28-XI-1943).
- 40. Las atribuciones de esa Jefatura Nacional fueron aprobadas por José Antonio Girón de Velasco mediante una orden de 18 de diciembre de 1950 (BOE 18-XII-1950); previamente se había nombrado, mediante decreto de 3 de octubre de 1950 (BOE 15-XI-1950), al primer Jefe Nacional del Seguro Obligatorio de Enfermedad, el magistrado Ramón Díaz Fanjul, que estaría al frente de la Jefatura dos años, pues cesó el 21 de julio de 1952 (BOE 7-VIII-1952). Apenas un par de años después, el 21 de julio de 1952, fue sustituido por el falangista Daniel Pérez y Sáenz de Miera, familiar del jefe de centuria de Falange José Pérez Sáenz de Miera, hombre de confianza del ministro Girón de Velasco (decreto de 21 de julio de 1952. BOE 7-VIII-1952), quien fue ratificado en su cargo en enero de 1954 (decreto de 22 de enero de 1954. BOE 22-I-1954)
- 41. [Editorial]. (1952). Petitorio oficial. Revista del Seguro de Enfermedad, 1(1), p. 36-38. De manera equivocada, en algunos números de la Revista del Seguro de Enfermedad se indica que este *Petitorio...* fue aprobado el 14 de noviembre de 1951 (*Cf.* [Editorial]. (1952). El Petitorio oficial. Revista del Seguro de Enfermedad, 1(2), p. 7-8).
- 42. La publicación de este concurso se ordenó por el Director general de Previsión, Fernando Coca, el 12 de diciembre de 1951 (BOE 14-XII-1951).
- 43. "En ninguno de los dos casos fue posible llegar a una unificación de criterio que quedase plasmado en el acuerdo correspondiente" [Editorial]. (1953). Editorial. Nuevo Convenio. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 100, p. 3-4.
- 44. Algunas voces autorizadas clamaban más allá en las limitación de las prestaciones ofertadas por el Seguro; Luis Jordana de Pozas, Director general del Instituto Nacional de Previsión pedía, en 1953, no solo una lista de medicamentos para la prescripción por los médicos del Seguro, también una sistematización de diagnósticos y métodos terapéuticos (Jordana de Pozas, L.

- (1953). Los Seguros Sociales en España en 1951 y 1952. Madrid, [Instituto Nacional de Previsión] Sucesores de Rivadeneyra).
- 45. Un falangista destacado: "... entre los hombres fuertes del primer momento [del franquismo] se encontraba Fernando Coca de la Piñera, tradicionalista y camisa vieja, que fue nombrado delegado provincial de Milicias, aunque unos años después llegaría a ser jefe provincial del Movimiento y Gobernador civil..." (Garrido González, L. (2011). El Jaén de Zabaleta en el primer franquismo (1940-1960). Boletín del Instituto de Estudios Giennenses, 204, p. 35-54; el texto en p. 39-40); también Cobo Romero, F., Ortega López. T. M. (2005). Franquismo y posguerra en Andalucía Oriental. Represión, castigo a los vencidos y apoyos sociales al régimen franquista, 1936-1950. Granada, Universidad de Granada (sobre Fernando Coca de la Piñera cf. p. 251-253). Fernando Coca fue nombrado Director general de Previsión mediante decreto de 27 de enero de 1950 (BOE 31-I-1950) y cesado por decreto de 8 de marzo de 1957 (BOE 15-III-1957), tras la sustitución de José Antonio Girón de Velasco por Fermín Sanz Orrio al frente del Ministerio de Trabajo y como consecuencia del aumento del protagonismo de los 'tecnócratas' en el Gobierno de Francisco Franco (Cf. Martínez Quintero, M.E. (2009). El INP entre 1957-1978: de los seguros sociales a la seguridad social franquista. En: S. Castillo, R. Ruzafa (coord.) La previsión social en la historia. Madrid, Siglo XXI, p. 265-288).
- 46. [Editorial]. (1952). Noticias. De la estancia en Valencia del Director General de Previsión. Revista del Seguro de Enfermedad, 1(1), p. 45-46.
- 47. [Editorial]. (1952). El Petitorio oficial. Revista del Seguro de Enfermedad, 1(2), p. 7-8 (cf. p. 7). Según se aclaraba en las páginas de la Revista del Seguro de Enfermedad publicadas en abril de 1952, el Petitorio... recogía los medicamentos que se "deberán recetar en el momento de su entrada en vigor (...) sin ninguna restricción en lo que a la fórmula magistral se refiere" y establecía lo que la dirección del Seguro denominaba "la orientación técnica", definida como: "La realidad farmacéutica que el médico practico tiene a su alcance y que, dentro de la heterogeneidad comercial, conviene fijar y delimitar a fin de facilitar la labor de todos dentro de las normas técnicas ya marcadas" (Op. cit., p. 7). Respecto a su vigencia, esta nota indicaba que el Petitorio... no entraría en vigor hasta que se determinase oficialmente por la Jefatura Nacional del Seguro.
- 48. El 19 de diciembre de 1951 se publica en la prensa una información relacionada con la implantación del *Petitorio...*, en la que se indica que este incluye los medicamentos que tienen un "positivo valor en el tratamiento de todas y cada una de las enfermedades" y que se elimina "todo lo inútil", evitando "esas recetas de complacencia que perjudican a todos" (La Vanguardia Española, 19-XII-1951, p. 6).
- 49. Orden de 28 de abril de 1953, del Ministerio de Trabajo, sobre información entre los asegurados en el Seguro de Enfermedad relativa al sistema de servicio de farmacia (BOE 30-IV-1953).
- 50. Preámbulo de la orden de 28 de abril de 1953, del Ministerio de Trabajo, sobre información entre los asegurados en el Seguro de Enfermedad relativa al sistema de servicio de farmacia (BOE 30-IV-1953).
- 51. Los modelos de papeletas de votación fueron hechos públicos en la orden de 28 de abril de 1953, del Ministerio de Trabajo, sobre información entre los asegurados en el Seguro de Enfermedad relativa al sistema de servicio de farmacia (BOE 30-IV-1953).
- 52. En el proceso, el sindicato único tenía un papel protagonista, pues la composición de cada mesa, donde se depositaría la papeleta individual y se reflejaría el resultado, estaría formada por el representante de la empresa, el enlace sindical y cuatro trabajadores asegurados designados de común acuerdo por la empresa y el enlace sindical (La Vanguardia Española, 1-V-1953, p. 1).
- 53. [Editorial]. Consulta a los afiliados al Seguro Obligatorio de Enfermedad sobre el suministro de medicamentos. El Ministro de Trabajo expone ampliamente el problema. ABC [Sevilla], 19-V-1953, p. 15.
- 54. [Editorial]. Girón habla de la consulta dirigida a los trabajadores acerca del Seguro de Enfermedad. ABC [Madrid], 26-V-1953, p. 11.
- 55. Op. cit. ut supra.

- 56. [Editorial]. Encuesta sobre el Seguro Obligatorio de Enfermedad. El petitorio y la industria química farmacéutica. ABC [Madrid], 4-XII-1953, p. 19. Este resultado también se recogió en el preámbulo de la orden de 28 de septiembre de 1953 (BOE 13-X-1953): "... habiéndose realizado de conformidad con la Orden de este departamento de 28 de abril último, la información entre los asegurados del Seguro Obligatorio de Enfermedad sobre la forma de facilitar las prestaciones de Farmacia y aceptando los deseos expuestos por una gran mayoría de los asegurados...".
- 57. La orden del Ministerio de Trabajo de 28 de septiembre de 1953 (BOE 13-X-1953) establece, en su artículo primero, "a partir de enero de 1954, en el Seguro Obligatorio de Enfermedad comenzará a regir el petitorio de las prestaciones farmacéuticas elaborado por la comisión mixta del mencionado seguro en este Ministerio".
- 58. Le acompañaba una circular, de fecha 4 de diciembre de 1953, firmada por Daniel P. Sáenz de Miera, hecha pública en el Boletín de Información... del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos: "Dispuesta la fecha de 1º de enero de 1954 para la implantación del petitorio de especialidades farmacéuticas del SOE, y al objeto de informar a ese Consejo General para conocimiento de la clase farmacéutica sobre la interpretación que ha de darse a dicho petitorio en sus distintos productos o grupos, esta Jefatura estima conveniente comunicarle las siguientes aclaraciones: / 1ª a) Si el producto figura reseñado sin la indicación de que puede ir asociado, ha de entenderse que solamente podrán ser dispensadas las especialidades en las que su composición figure solo el producto a que se refieran. / b) si a continuación del producto se reseña que puede ser solo o asociado, se entenderá que pueden dispensarse todas aquellas especialidades en las que en su composición se encuentre solo o asociado a otros productos. En los grupos en que específicamente se indica el producto al que puede asociarse, se comprende que como asociación únicamente se admitirá la del producto expresado. / c) Se observarán rigurosamente las concentraciones marcadas en los productos que se hacen resaltar. / d) Las formas farmacéuticas de especialidades que pueden dispensarse serán exclusivamente aquellas que se expresan en cada producto. / 2ª Hasta tanto se disponga de un catálogo que recopile las especialidades farmacéuticas que puedan formularse, esta jefatura, en evitación de dificultades que pudieran surgir en el primer periodo de implantación de las bases que se adjuntan, ha acordado se observe una cierta elasticidad por lo que se refiere a las asociaciones o concentraciones relativas a las especialidades de cada grupo o producto o aquellas otras incidencias naturales en este tiempo. Por ello, las oficinas de farmacia podrán dispensar las recetas que se les presenten aunque estas no se ajusten en cuanto a su asociación o concentración a lo exigido en las bases. / 3ª Desde 1 de enero los farmacéuticos cumplirán, con carácter obligatorio, la orden de no dispensar ninguna especialidad bajo forma farmacéutica diferente a la señalada en cada producto o grupo del petitorio. Así se tendrá en cuenta que las formas farmacéuticas de jarabes, elixires y granulados solamente se encuentran amparadas en las especialidades correspondientes a los productos yoduros orgánicos, alcaloides totales de belladona, P.A.S. y salicil-cinconil y fenil-quinolin carbónico y sus asociaciones. / 4ª Consecuentemente con el periodo de caducidad de la receta, podrán, dispensarse durante los nueve primeros días del mes de enero de 1954 las recetas que hayan sido prescritas durante los nueve últimos días del mes de diciembre de 1953, de acuerdo con la caducidad de cada receta, aunque estas no se ajusten al petitorio. / 5ª En relación con las especialidades correspondientes a los productos: estreptomicina, cloranfenicol-cloromicetina, aureomicina, terramicina, hidracida del acido isonicotínico, bromuro de metantelina, cortisona y adreno-corticotropa hormona del lóbulo anterior de la hipófisis, la dispensación se verificará exclusivamente previa la presentación de la receta especial destinada a esa medicación (modelo numero 3 o modelo numero 4, cruzada con la inscripción «Antibióticos») visada por el inspector de servicios sanitarios. / En estas recetas especiales se podrán prescribir varias unidades de envase de una especialización, siempre sujeta a la autorización de la inspección de servicios sanitarios. / Tanto si es del modelo número 3 como si es del modelo numero 4, en el momento de su dispensación se entregará en las farmacias el original y copia de la receta. / 6ª Desde la mencionada fecha de 1° de enero de 1954, el seguro de enfermedad se hará cargo para su abono únicamente de las recetas de especialidades farmacéuticas que se ajusten a las presentes normas. / 7ª Si una entidad reclamase previo pago de su factura por entender que se han dispensado a su cargo medicamentos que ella estima no han de ser facilitados, esta reclamación será elevada a la comisión mixta central, que determinará con carácter general la procedencia o no de la mencionada dispensación. / Por Dios, España y su revolución nacional-sindicalista. / Madrid, 4 de diciembre de 1953. El jefe nacional: Daniel P. Sáenz de Miera" (Sáenz de Miera, D. P. (1953).

- Nuevo Petitorio de especialidades farmacéuticas del S.O.E. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 103, p. 8-10).
- 59. El convenio fue suscrito por Ramón Díaz Fanjul, Director de Asistencia Sanitaria e Instalaciones del Seguro Obligatorio de Enfermedad y Ramón Turrientes Miguel, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España; se sometió al conocimiento del Ministro de la Gobernación, que lo aprobó, en cumplimiento de la Orden de 13 de febrero de 1953 (BOE 8-III-1953).
- 60. "10. Las especialidades farmacéuticas en envase normal, excepto las elaboradas exclusivamente con uno o más antibióticos, se abonarán por el Seguro al precio marcado para el público, deduciendo (timbre excluido) el 6,66 por 100, que se deriva de la Orden de 10 de mayo de 1948, más el 18 por 100 de descuento, incrementado por el artículo 1º de la primera Orden de 13 de febrero anterior. / Este último tanto por ciento se distribuirá entre los sectores profesionales, cargando el 5 por 100 sobre la farmacia, el 3 por 100 sobre el almacén y el 10 por 100 sobre los laboratorios preparadores de especialidades farmacéuticas. / 11. Las especialidades farmacéuticas en envase normal elaboradas exclusivamente con uno o varios antibióticos, sin que entre en la composición de su fórmula ningún otro fármaco activo, se liquidarán por el Seguro al precio marcado para el público, deduciendo (timbre excluido) el 6,66 por 100, mas el 8 por 100 que previene el artículo 2º de la segunda Orden de 13 de febrero próximo pasado; este último descuento se distribuirá a razón de un 5 por 100 sobre la farmacia y un 3 por 100 sobre almacén" ([Editorial]. (1953). Información del Consejo. Nuevo Convenio con el Seguro Obligatorio de Enfermedad. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 100, p. 4-11).
- 61. "Adjunto tenemos el gusto de remitirle 'la relación de grupos de especialidades (petitorio)' que será implantado a partir de 1º de enero de 1954 y que, por lo tanto, son los medicamentos que pueden suministrarse a los asegurados y beneficiarios del seguro obligatorio de enfermedad; igualmente le acompañamos una Circular, firmada por la Jefatura Nacional del mencionado Seguro, en la que se determina cómo ha de realizarse el servicio farmacéutico a partir de la mencionada fecha. / Muy en breve recibirán también esta misma documentación, complementada con una relación de las especialidades incluidas en el petitorio oficial, a fin de que lo hagan llegar a cada uno de sus colegiados que ejerzan la profesión con oficina de farmacia abierta al público. / Recordamos a ese Colegio, para que a su vez lo efectúe a todos los compañeros que ejerzan bajo esta modalidad, el párrafo último de la base 7ª del convenio, que dice: 'para la dispensación de productos no relacionados en él (petitorio) se exigirá la autorización de la inspección de servicios sanitarios del seguro, extendida al dorso de la propia receta oficial'. / Por nuestra parte, y durante las horas de oficina, podremos informar sobre aquellas dudas que se susciten con motivo de la aplicación de las adjuntas normas" ([Editorial]. (1953). Información del Consejo. Circular nº 169. Año de 1953. Asunto: Aplicación Petitorio Seguro de Enfermedad. Boletín de Información - Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 103, p. 6-7).
- 62. "Como continuación a nuestro oficio circular numero 169, y en el cual anunciábamos el próximo envío de documentación para hacerla llegar a cada uno de los farmacéuticos que dispensan medicamentos al SOE, hemos de manifestarles lo siguiente: / La circular que remitíamos a ustedes, firmada por el Jefe Nacional del SOE, no ha sido aun en nuestro poder el número necesario de ejemplares para todos los farmacéuticos establecidos, y en vista de lo cual hemos mandado imprimirla con toda urgencia y, en cuanto obren en nuestro poder, se los remitiremos para que ustedes puedan hacerlo a los colegiados. / En el día de hoy se nos remite el petitorio de especialidades farmacéuticas y sus normas aclaratorias, y por este mismo correo les enviamos ejemplares, igual al número de colegiados establecidos. / Igualmente se nos comunica por la lefatura Nacional del Seguro de Enfermedad que se está imprimiendo un catálogo que relaciona las especialidades comprendidas en el petitorio, el cual, y con objeto de que llegue a poder de los Colegios y colegiados lo antes posible, será enviado directamente desde Valladolid, donde se está editando, a las Jefaturas Provinciales del Seguro (Delegación Provincial), para que por éstas sean puestos a disposición de los Colegios Provinciales, en los primeros días del mes de enero, el número de ejemplares necesario para entregarlos a los colegiados con oficina de farmacia abierta al público. / En el próximo correo remitiremos la circular firmada por el Jefe Nacional a que antes nos hemos referido. / En lo que se refiere a la tarifa, aún en estos días se está ocupando la comisión de la revisión de los precios acoplados al actual momento, y es aspiración

- de este Consejo que se revisen también, en cuanto sea posible, los honorarios profesionales, y así lo discutirá en la Comisión, con el deseo de que antes de que ustedes hayan de tasar las recetas correspondientes al mes de enero estén realizadas aquellas modificaciones..." ([Editorial]. (1953). Información del Consejo. Circular nº 170. Año de 1953. Asunto: Envío Petitorios y normas aclaratorias. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 103, p. 7-8).
- 63. [Editorial]. (1954). Información del Consejo. Entre los días 15 al 24 de Febrero el Consejo General de Colegios Farmacéuticos se reunió en sesión plenaria. Los Sres. Consejeros celebraron un importante cambio de impresiones con el Excmo. Sr. Ministro de la Gobernación. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 104, p. 13-14.
- 64. [Editorial]. (1954). S. E. el Jefe del Estado recibe al Consejo General de Colegios Farmacéuticos de España. La Audiencia se celebró en el Palacio de El Pardo al mediodía del 24 de febrero. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 104, p. 10-12.
- 65. "Y el Consejo acuerda constituir una Ponencia que lleve a cabo un detenido estudio del asunto..." ([Editorial]. (1954). El Consejo Nacional del Seguro Obligatorio de Enfermedad. Revista del Seguro de Enfermedad, 2(4), p. 35-36). Asistió a su constitución el ministro Girón de Velasco; en el mismo día el Consejo celebró su primera reunión, presidida por su presidente delegado, Fernando Coca de la Piñera.
- 66. [Editorial]. (1955). Comunicación de la Jefatura Nacional del S. de Enfermedad sobre especialidades amparadas en el Petitorio. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 108, p. 10-11. [Editorial]. (1955). Información del Consejo. Circular núm. 211. Año de 1955. Asunto: Aplicación nuevo Petitorio S.O.E. Boletín de Información Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 115, p. 9-10.
- 67. "Aprobada la revisión del Petitorio de Especialidades Farmacéuticas por el Consejo General del Seguro de Enfermedad en fecha 6 de diciembre actual, y debiendo comenzar en fecha que oportunamente se indicará la aplicación del mismo, es deseo de esta Jefatura, al igual que en enero próximo pasado, el clasificar y relacionar en un catálogo el nombre de las especialidades que, con arreglo a su composición, concentración y forma farmacéutica, se encuentran amparadas por el petitorio y dotar de un ejemplar a cada uno de los facultativos que intervienen en el Seguro. / Suponiendo que al laboratorio que usted dirige le interesará que las especialidades farmacéuticas que prepara se encuentren incluidas en el petitorio, y figuren en el aludido catálogo, es por lo que le rogamos que, conforme al modelo de ficha que se adjunta, nos clasifique dichas especialidades: Número de registro de la Dirección General de Sanidad. Composición completa y concentración. Forma farmacéutica. Envase y capacidad. / Dicha documentación debidamente cumplimentada ha de obrar en esta jefatura nacional entes del 1º de febrero de 1955" ([Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad]. (1955). Comunicación de la Jefatura Nacional de S. de Enfermedad sobre especialidades amparadas en el Petitorio. Boletín de Información - Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 108, p. 10-11).
- 68. El Consejo General de Colegios de Farmacéuticos emitió la circular número 207, de fecha 12 de marzo de 1955: "Por la Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad se ha dirigido a este Consejo el siguiente oficio: 'Para su conocimiento, me complazco en remitir a usted cinco ejemplares de la orden comunicada dictada por el Ministro de Trabajo en fecha 2 del mes en curso [marzo 1955], sobre el petitorio de especialidades farmacéuticas del Seguro de Enfermedad. Dios guarde a usted muchos años. Madrid 5 de marzo de 1955'. / Copia de la orden comunicada que se cita: 'Ministerio de Trabajo. Dirección General de Previsión. Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad - Con fecha de hoy, el Ministro de Trabajo ha dictado la siguiente orden comunicada: "El petitorio de especialidades farmacéuticas del SOE implantado con fecha 1º de enero de 1954 y posteriormente revisado por el Consejo Nacional del citado Seguro en 6 de diciembre del mismo año, plantea problemas de interpretación en algunos grupos medicamentosos en él reseñados y que es preciso considerar conforme el criterio que sirvió de base para su elección, pues de no ser así se desnaturalizaría aquél, además de no lograrse la eficacia que con su aplicación se persigue. Al objeto de aclarar dichos problemas debidamente, este Ministerio se ha servido disponer: art 1º queda facultada la Dirección General de Previsión para que la clasificación de especialidades farmacéuticas que puedan ser o no incluidas en los

distintos grupos del petitorio pueda interpretar que la asociación de otros productos que lleven dichas especialidades sea precisamente la que convenga o no a la acción terapéutica prevista al redactarse el petitorio en vigor. Art 2º se faculta a la Dirección General de Previsión para que pueda acordar las normas que exija la ejecución de lo ordenado. Art. 3º se derogan los preceptos que se opongan a lo dispuesto 2 de marzo de 1955'. / Lo que trasladamos a ese Colegio a los oportunos efectos 12 de marzo de 1955". ([Editorial]. (1955). Información del Consejo. Circular nº 207. Año de 1955. Asunto: Seguro de Enfermedad. Determinación de Especialidades del Petitorio. Boletín de Información - Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 110, p. 7).

- 69. "Existe ya una experiencia de las ventajas e inconvenientes de su utilización, y se han recogido opiniones y sugerencias que han sido expuestas, primero antes del periodo de su implantación y luego en lo que la práctica ha ido señalando en toda esta etapa de su vigencia. / Por eso ha parecido conveniente una revisión y actualización del Petitorio que recoja todo lo que hemos apuntado. Y, en efecto, ha sido aprobada su revisión por el Consejo Nacional del Seguro de Enfermedad en sesión de 6 de diciembre de 1954 (...) / Era mucho más cómodo para los médicos, y para el propio Seguro, que no hubiese necesidad de encasillar las especialidades farmacéuticas en ninguna clase de Petitorio; y no habría tal necesidad si existiese una ordenación rigurosa de las mismas comercialmente, como existe sanitariamente; eso sin aludir a la superabundancia de especialidades, que es muchas veces origen de desconcierto a la hora de recetar..." ([Editorial]. (1955). Los específicos y la farmacia. Revista del Seguro de Enfermedad, 3(17/18), p. 2-4; cf. p. 2-3).
- 70. Op. cit. ut supra, cf. p. 2-3.
- 71. Además, el editorial indicaba que estaba a punto de terminarse el trabajo de revisión, por lo que la fecha de su entrada en vigor sería en breve, una vez que el Consejo Nacional del Seguro de Enfermedad lo entregase: y avanzaba algunos detalles de esa revisión: "Al nuevo Petitorio revisado se llevarán nuevos grupos y se discriminarán otros. Se incluirán grupos tales como: Fermentos pancreáticos: Triexifenidil y similares, protectores de la célula hepática-Metionina. Colina e Inositol. / Se incluirán también el Pirofosfato de aneurina, Cloruro amónico, T.B.1, Trimetadiona, Dinitilo succínico; los preparados para contraste cromocitoscópicos, los derivados nitrofuránicos, etc., etc. / También se han ampliado algunas formas farmacéuticas dentro de ciertos grupos, tales como la forma inyectable para la Aureomicina y Terramicina, los comprimidos para mercurio y mercuriales, Luminal, etc. / Algunos grupos que figuraban con la indicación terapéutica se han discriminado en los productos que tienen aquella acción. Se han especificado, además, las asociaciones que se permiten en ciertos grupos; mientras que en otros, tales como los antihistamínicos, se ha eliminado alguna forma farmacéutica y se han limitado también sus asociaciones. / En una palabra, se ha recogido todo lo que es valioso en el terreno científico, dando al Petitorio la máxima agilidad y extensión para hacerlo cómodo y capaz de resolver todas las terapéuticas actuales" (Op. cit. nota 69; cf. p. 3-4).
- 72. "La Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad, de la Dirección General de Previsión (Ministerio de Trabajo) comunica que, verificada la clasificación de especialidades farmacéuticas correspondientes al Petitorio revisado del Seguro de Enfermedad, los laboratorios de productos farmacéuticos pueden acudir, mediante persona que les represente, a la Jefatura Nacional del Seguro de Enfermedad, Marqués de Urquijo, 47, planta 5ª, en horas de 12 a 1, para recibir la información que precisen o solicitar el que se clasifique alguna nueva especialidad que hubiese sido registrada con posterioridad a las presentadas, ya que en principio se tiene fijada la implantación del mencionado petitorio revisado para fecha 1º de octubre del corriente año [1955]" (La Vanguardia Española, 21-VI-1955, p. 1).
- 73. Fuente: Informe sobre la prestación farmacéutica en el Seguro de Enfermedad del Instituto Nacional de Previsión, Octubre de 1958 (Archivo histórico del Instituto Nacional de Previsión (INGESA), documento 69; *cf.* p. 199).
- 74. La Revista del Seguro de Enfermedad avanzó la noticia de que, al final de 1955, estaría en pleno funcionamiento la Residencia sanitaria de Zaragoza 'José Antonio'; posteriormente, Alejandro Gasca sería nombrado director de esta Residencia. ([Editorial]. (1955). Noticiario. Nuevo Ambulatorio en Zaragoza. Revista del Seguro de Enfermedad, 3(16), p. 45-46).

- 75. "Después de año y medio aproximadamente de aplicación de las normas dadas por la Jefatura Nacional, en relación del Petitorio, vamos a hacer un breve comentario sobre la experiencia adquirida. / La modificación establecida en las prestaciones tuvo sus naturales repercusiones: por una parte, al no estar incluidos en el Petitorio algunos jarabes, reconstituyentes y vitaminas que creían necesarios, se produjo cierto desconcierto entre los clientes asiduos a los consultorios del SOE, al verse privados de lo que diariamente constituía su 'alimento de lujo' (...) / En general, no se ha observado ninguna anomalía sobre el uso indebido de los antibióticos, comprobando en todos los casos su uso normal. / Además de limitar la prescripción del resto de los preparados farmacéuticos, sería necesario gravar un tanto por ciento por cada receta con cargo al beneficiario. Se dirá que este proceder es poco social, que no se debe gravar la economía del enfermo, de por sí agravada como consecuencia de la enfermedad; todo ello es cierto y no faltará quien defienda estos postulados, pero debemos vivir de realidades y no de ideales (...) / La defensa del beneficiario para resarcirse del tanto por ciento impuesto a cada receta sería que el médico le prescribiera dos, pero ello podríamos evitarlo ejerciendo un buen control a través de las copias y visitando los consultorios con asiduidad, porque, a nuestro juicio, la verdadera inspección no se ejerce desde un despacho (...) / Respecto a las fórmulas magistrales, hoy día están olvidadas, su preparación, en determinados casos no ofrece dificultades, y su garantía terapéutica se puede equiparar a la que puede suministrar cualquier laboratorio (...) La fórmula magistral, comprobando su bondad terapéutica, tendría cierta repercusión en los gastos de farmacia..." Gasca, A. (1955). Comentarios sobre las prestaciones farmacéuticas. Revista del Seguro de Enfermedad, 3(16), p. 9-11.
- 76. "La socialización de la farmacia. (...) Quincuagésima.- Que existe una opinión bastante generalizada en el sentido de que si se ha llegado a socializar la medicina, no hay razón alguna para que se mantenga criterio distinto respecto de las prestaciones farmacéuticas dentro del S.O.E; que constituyendo el Seguro un servicio público de salud, podrían dictarse normas sobre nombramientos de 'especialistas farmacéuticos'; con establecimiento propio, que expidieran por cuenta de aquel las fórmulas magistrales y especialidades incluidas en el Petitorio (...) Ouincuagésimo primera.- Que se propugna por algunos la tesis, hoy bastante defendida, de que el Seguro debería fabricar por su cuenta la mayoría de las especialidades que figuran incluidas en el Petitorio, o alternativamente, llegar a la creación de establecimientos propios expendedores de toda clase de productos, liberando a las Farmacias de esta función. Estos criterios son los más radicales, pero están animados por la necesidad de que el actual sistema de producción y venta de medicamentos utilizados por el Seguro, debe ser modificado, aún cuando ello implique sacrificar cualquier clase de intereses particulares o profesionales, siempre subordinados al interés general y al bien común". Informes sobre el Seguro de Enfermedad: Informe s/ [sobre] servicios de la Beneficencia y el SOE [Seguro Obligatorio de Enfermedad]. Informe s/ [sobre] prestaciones farmacéuticas en el SOE. Informe s/ [sobre] procedimiento de revisión [de] recetas SOE. (Archivo histórico del Instituto Nacional de Previsión (INGESA). Documentación relativa al Seguro de Enfermedad, signatura: 23/1976. C-4/23-B3-C3 [1932-1963], leg. 49-L).
- 77. "En las últimas sesiones celebradas por las comisiones provinciales del Seguro de Enfermedad, se ha formulado una propuesta para la supresión del petitorio de prestaciones farmacéuticas y libertad de prescripción de medicamentos dentro del Seguro Obligatorio de Enfermedad, con participación del asegurado en su costo" (ABC [Sevilla], 13-IV-1961, p. 44).
- 78. Decreto 3157/1966, de 23 de diciembre, por el que se regula la dispensación de especialidades farmacéuticas en el Régimen General de la Seguridad Social (BOE 30-XII-1966).
- 79. Decreto 907/1966, de 21 de abril, aprobado el texto articulado primero de la Ley 193/1963, de 28 de diciembre, sobre Bases de la Seguridad Social (BOE 22-IV-1966).

INFORMACIÓN ACADÉMICA



Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el cuarto trimestre del año 2013, hemos realizado un total de doce sesiones científicas, de la cuales tres fueron dedicadas a tomas de posesión de nuevos Académicos, uno de Número y dos Nacionales, tres conferencias, dos mesas redondas, un ciclo de conferencias, una presentación de un libro, una Sesión Conmemorativa de los Premios Nobel 2013 y un acto conjunto de tres Reales Academias.

El 3 de octubre, tuvo lugar la Conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre "Reflexiones sobre la I+D+I. Investigar en España, ¿una apuesta con futuro?", pronunciada por el Dr. José A. Guitérrez-Fuentes quien fue presentado por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega.

Los siguientes elementos definen nuestra situación actual en I+D+I: (1) el sector industrial se encuentra seriamente afectado por las imprevisiones y la actual crisis económica por lo que la locomotora de la ciencia va a seguir siendo el sector público; (2) está pendiente una reforma de la Universidad, que debe ser una institución clave en la producción de ciencia; (3) para orientar la investigación hacia los intereses reales del país, la evaluación y priorización de áreas y objetivos concretos no admite más demora, a la vez que se genera, por el efecto de la concentración de esfuerzos, una masa crítica competitiva; y, por último, (4) el armazón administrativo y gestor sobre el que gravita la ciencia pública española es incapaz de atender las necesidades presentes y futuras, haciendo falta una mayor modernidad tecnológica, capacidad y flexibilidad. Dicho esto, deberíamos tener claro que, como país, nuestro objetivo no puede ser competir con los EEUU, ni es ese nuestro modelo. Somos lo que somos, fruto de nuestra historia, pero nos enfrentamos a una situación nueva que afrontada con inteligencia y decisión nos puede aproximar a la posición deseada y que se define por: (1) atravesamos una coyuntura compleja que debería hacer comprensibles y facilitar la asunción de las estrategias y reformas necesarias; (2) existe un estado de opinión social y política favorables; (3) tenemos los mimbres que hay que ensamblar, coordinar y dirigir. El mundo de la Ciencia necesita ver en las autoridades esa decisión y claridad de ideas; y (4) en un mundo globalizado, disfrutamos de una posición de privilegio al estar integrados en la UE y poder apostar por Iberoamérica con ventajas. Todo lo dicho debe resumirse en la necesidad de disponer de una estrategia nacional de I+D, construida atendiendo a premisas de modernidad y eficacia, y que disponga de un amplio soporte social y político que sea garantía de la estabilidad imprescindible y de los recursos suficientes.

El 10 de octubre tuvo lugar la conferencia celebrada en colaboración con la SEBBM con motivo de su Cincuentenario, sobre "La aventura extracelular del ATP: nuevos receptores, nuevos fármacos y nuevas ideas", pronunciada por la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, Académica de Numero de la RANF y Socio de Honor de la SEBBM quien fue presentada por el Presidente de la SEBBM el Prof. Dr. Federico Mayor Menéndez.

La importancia del ATP como moneda energética en el interior celular, como sillar esencial en la síntesis de ácidos nucleicos y como coenzima/sustrato en reacciones enzimáticas, eclipsó durante mucho tiempo sus funciones como mensajero extracelular. La naturaleza suele utilizar para las funciones más relevantes aquello que es abundante, ya que así no se verá comprometida su función en los momentos de mayor escasez. Este es el caso del ATP, nucleótido mayoritario dentro de la célula y descrito como uno de los componentes de la sopa prebiótica.

El ATP está plenamente aceptado, en la actualidad, como mensajero extracelular, siendo considerado como uno de los primeros en ser utilizado entre organismos unicelulares, los invertebrados primitivos y los primeros vertebrados. No podemos olvidar que para alcanzar el exterior celular el ATP tienen que salir y los mecanismos y posibilidades son todavía discutidos. La reciente identificación del gen y clonaje del transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, ha cambiado la forma de pensar y lo ha igualado con otros mensajeros y neurotransmisores, inclinando su liberación hacia el mecanismo de liberación controlado por exocitosis.

El ATP extracelular es rápidamente degradado por una amplia gama de familias de ecto-enzimas conocidas como ecto-nucleotidasas que son objeto de intensa investigación como dianas en trauma cerebral, ictus y trasplantes. Antes de ser degradados el ATP y otros nucleótidos extracelulares actúan sobre receptores purinérgicos P2. De estos existen dos grandes familias, los P2X que son inotrópicos y pertenecen a los más antiguos desde el punto de vista evolutivo, y los P2Y que son metabotrópicos y pertenecen a los clásicos siete hélices transmembranares.

Los receptores metabotrópicos P2Y, se encuentran en todas las células de mamífero. La familia consta de ocho subtipos clonados hasta la actualidad y son las dianas que han revolucionado la farmacología en diversos campos. Como ejemplo destacado está el receptor P2Y12 plaquetario, cuyo agonista fisiológico es el ADP, que produce agregación y origina trombos en el torrente sanguíneo cuando se

descontrola. En el año 2001 se clonó el receptor y se descubrió que el fármaco antitrombótico conocido como clopidogrel (PLAVIX) era un antagonista del mismo. Hoy día existen múltiples fármacos antagonistas del receptor P2Y12 que son ampliamente utilizados para evitar el ictus cerebral y los problemas de formación de coágulos en cirugías agresivas.

En el sistema nervioso central el papel del ATP como neurotransmisor es cada vez más indiscutible y relevante. La amplia presencia de receptores P2X y P2Y en neuronas y glía, bien definidos los subtipos, e incluso con distribuciones precisas en la compleja topología neural de cada célula, apunta a un papel especifico y bien definido con repercusiones fisiopatológicas. El ATP y otros nucleótidos se encuentran en las vesículas secretoras almacenados conjuntamente con catecolaminas, acetilcolina, o serotonina, entre otros neurotransmisores, e incluso hay evidencias de que pueda estar almacenado con GABA y glutamato. Lo que explicaría sus posibilidades de control de los principales sistemas clásicos de neurotransmisión.

Entre todos los receptores P2X, nuestro grupo ha puesto especial énfasis en el receptor P2X7 pues es muy abundante en las terminales sinápticas de todas las áreas cerebrales. En las primeras etapas del desarrollo, en el cono de crecimiento neural el receptor P2X7 es el elemento de control decisorio en su elongación y ramificación estando modulada su actividad por la presencia de los receptores metabotrópicos P2Y1 y P2Y13, y de ecto-nucleotidasas. Una situación similar se produce en las lesiones traumáticas que ocasionan epilepsia, en el animal adulto, en este modelo el receptor P2X7 aparece en las nuevas prolongaciones y ramificaciones de las neuronas nuevas y de las supervivientes en el hipocampo. El control de la actividad excitadora del receptor P2X7 por el antagonista, BBG, azul brillante G, ha demostrado ser un buen agente para el tratamiento de las epilepsias refractarias, in vivo.

En la enfermedad neurodegenerativa de Huntington, los síntomas de pérdida de control del movimiento van emparejados con el incremento del receptor P2X7 en los axones que conectan el cortex motor con el estriado. El incremento desmesurado de actividad de este receptor con la correspondiente entrada de calcio destruye las terminales que conectan esta vía motora. Otros autores han encontrado resultados similares en las terminales de la substancia nigra que van al estriado los cuales están mermados en la enfermedad de Parkinson. Respecto a la enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer, hay muchos datos y estudios, y nuestro grupo ha aportado resultados prometedores. Los datos más relevantes indican que los receptores P2X7 y P2Y2 participan en una sinfonía compleja, en donde los receptores de nucleótidos modulan la actividad in vivo de las actividades secretasas que procesan la proteína precursora de amiloide, APP. Los agonistas del

P2Y2 y los antagonistas del P2X7, se presentan como excelentes dianas capaces de reducir las placas de amiloide "in vivo".

El 17 de octubre, tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Farmacia, la Conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, titulada: "Amebas de vida libre: ¿patógenos emergentes", pronunciada por el Dr. Basilio Valladares Hernández quien fue presentado por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

El 24 de octubre se celebró la Mesa Redonda celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre "Productos naturales, diterpenos y patologías con base inflamatoria", coordinada por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Ángel Mª Villar del Fresno. Contó con las ponencias de la Prof. Dra. Beatriz de las Heras Polo quien disertó sobre "Relaciones estructurafunción en derivados terpénicos"; y del Prof. Dr. Lisardo Bosca Gomar quien habló sobre "Mecanismos de acción de derivados diterpénicos".

Relaciones estructura-función en derivados terpénicos.

Beatriz de las Heras, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Los productos naturales han desempeñado tradicionalmente un papel destacado en la obtención de nuevos fármacos debido a la diversidad estructural que aportan. A pesar de las expectativas creadas por el desarrollo de la Química Combinatoria y los ensayos de "Screening de alto rendimiento" en el pasado, en la actualidad ha vuelto a resurgir el interés por los productos naturales. Los terpenos son un grupo químico de metabolitos secundarios que presentan una gran variedad de actividades biológicas como agentes antitumorales, antiinflamatorios y antibacterianos, entre otras. En concreto, los diterpenos han adquirido un gran interés científico en épocas recientes por su potencial farmacológico, particularmente en áreas como el cáncer y la inflamación. Ejemplos representativos son los diterpenos antitumorales taxol y sus análogos, o el diterpeno triptolide, en fase de ensayos clínicos. Estas moléculas pueden servir como cabezas de serie ("leads") aportando estructuras novedosas para el desarrollo de análogos, generando de este modo quimiotecas dirigidas a optimizar las propiedades farmacológicas (mayor eficacia y menor toxicidad) y farmacéuticas, mediante evaluación de las relaciones estructura química-actividad (SAR). En este contexto, se ha evaluado la actividad biológica de numerosas quimiotecas basadas en distintos terpenos. Estudios bioquímicos y farmacológicos llevados a cabo con series de derivados diterpénicos de tipo kaurano y labdano han demostrado el potencial de estos compuestos en patologías de base inflamatoria, debido a su actividad en la regulación del proceso inflamatorio, de la apoptosis en cáncer y, más recientemente, en cardioprotección, habiéndose identificado las dianas moleculares de actuación de los mismos. Los resultados obtenidos en estas investigaciones apoyan la importancia de los compuestos diterpénicos como una estrategia prometedora para la obtención de nuevas moléculas bioactivas con posible aplicación terapéuticas en distintas enfermedades.

Mecanismos de acción de compuestos diterpénicos.

Lisardo Boscá, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid. La utilización de plantas medicinales es un recurso terapéutico ampliamente establecido a lo largo de la historia. Estudios etnobotánicos sobre las plantas utilizadas en medicina tradicional confrontados con determinaciones analíticas indican que algunas de estas plantas poseen moléculas de potencial interés farmacológico. El ginkgo biloba, el hinojo, la alcachofa, el jengibre, la cúrcuma y el guggulu (Commiphora mukul) parecen contribuir a una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, con una posible acción preventiva frente a la aterosclerosis. Otros como la erica y la albahaca están menos estudiados y su actividad sobre el sistema cardiovascular está sin establecer. La administración de estas plantas es puramente empírica por parte de los herboristas. Por ello, el aislamiento de moléculas activas y la caracterización de sus efectos biológicos permiten establecer y optimizar sus propiedades terapéuticas. De este modo, de los extractos de plantas se ha pasado a la identificación de familias de moléculas, muchas de ellas derivados de estructuras terpenoides, que han servido como 'leads' para el desarrollo de futuras series de interés en investigación biomédica. Así, en los últimos años se ha estudiado la capacidad de terpenos naturales y sintéticos para inhibir la respuesta inflamatoria. Estos trabajos señalan a NF-kB como una vía de señalización común en la acción de estos compuestos, lo que explicar efectos anti-inflamatorios. sus antiapoptóticos inmunomoduladores. De hecho, la producción de la mayoría de las citoquinas está regulada por el factor de transcripción NF-kB. Junto a ello, algunas de estas moléculas presentan una potente actividad citotóxica y/o citostática cuyos mecanismos de acción se discutirán en la presentación. Igualmente, NF-kB regula la transcripción de dos de las principales enzimas responsables de la respuesta inflamatoria, NOS-2 (óxido nítrico sintasa inducible) y COX-2. Por otro lado, dentro de esta vía se han identificado diversas dianas, destacando la inhibición de la activación del complejo IKK, el bloqueo de la fosforilación de p65 y la inducción de las proteínas inhibidoras IkBa y Bcl-3. En esta misma línea, se ha comprobado que determinados ent-kauranos inhiben la actividad de NF-kB a través de efectos específicos anteriores a la activación de la quinasa NIK. Otros diterpenos, como el ácido abiético e incluso el propio ácido acantoico parecen ejercer sus efectos antiinflamatorios, además de inhibiendo a NF-kB, a través de la activación de miembros de la familia de receptores nucleares activados por ligandos como PPARγ y LXR, todos ellos con una clara actividad antiinflamatoria.

En el caso de los triterpenos se han descrito importantes efectos proapoptóticos en células de mieloma mediante una disminución de los niveles de Bcl-2 y Hsp27, e inhibiendo NF-kB. Por ejemplo, el ácido botulínico, induce apoptosis selectiva sobre determinados tipos de células tumorales. Investigaciones sobre los mecanismos implicados en este efecto sugieren que el triterpeno inhibe la actividad de NF-kB pero mantiene intacta la señalización a través del receptor de TNF- α , lo que explica su potente actividad pro-apoptótica, la atenuación de la inflamación y la modulación de la respuesta inmune. Además, se ha descrito que la inhibición de NF-kB por triterpenoides bloquea la expresión de MMP-1 y MMP-13 e induce la síntesis de Bcl-3, un miembro de la familia de IkBa. En esta sesión se analizarán los mecanismos moleculares a través de los cuales estas moléculas ejercen sus acciones biológicas.

El **31 de octubre** tuvo lugar la presentación del libro titulado "La tutela imperfecta. Biología y Farmacia en la España del primer franquismo", con las ponencias del Excmo. Sr. D. Fco. Javier Puerto Sarmiento, Académico de Numero de la RANF; Prof. Dr. Antonio Gonzalez Bueno, Académico Correspondiente de la RANF y el Prof. Dr. Alfredo Baratas, Prof. titular de Historia de la Ciencia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM.

El sistema científico y tecnológico implantado durante los primeros años del franquismo, en los que la economía estuvo basada en los principios de autarquía, enfatizó los aspectos aplicados de la investigación básica. En este marco, el colectivo farmacéutico adquiere un especial protagonismo y lo hace desde distintos frentes: desde su actividad académica, tanto en las universidades como en el CSIC; desde la cómoda situación profesional que su diligente participación en la contienda y en el diseño del nuevo Estado deparaba a quienes se vincularon al Ejército; y desde la industria privada, motor de la renovación terapéutica y, en algún caso, refugio de los que optaron por el exilio interior. Este volumen recoge las aportaciones de un grupo de investigadores que, durante los últimos años, se han ocupado de estudiar las relaciones entre ciencia, farmacia y sociedad durante los 'años grises' del primer franquismo.

El 7 de noviembre se celebró en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia la sesión de Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Francisco Sánchez Madrid, Scientific Director del Instituto de Investigación Sanitaria Princesa IIS-IP; Professor of Immunology de la Universidad Autónoma de Madrid, quien pronunció su conferencia titulada: "Nuevos Mecanismos de Comunicación Intercelular en la Respuesta Inmune". Fue

presentado por la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la RANF.

Nuestra investigación aborda las interacciones moleculares y celulares que controlan la orientación y la migración dirigida del leucocito, así como el estudio de la funcionalidad de las distintas etapas de la sinapsis inmunológica y de los mecanismos de transferencia de información genética en las interacciones celulares inmunes. Este conocimiento es esencial para la comprensión de los mecanismos de activación y amplificación que se producen durante la respuesta inmune. Para el desarrollo del trabajo experimental se dispone de una tecnología de imagen innovadora y muy avanzada que permite la visualización y cuantificación in vivo de procesos biológicos y celulares durante el desarrollo de modelos experimentales de enfermedades con componentes inmunológicos. De este modo, se analizan procesos biológicos complejos, como la adhesión de los leucocitos al endotelio y su posterior extravasación a tejidos, así como la interacción y sinapsis entre células T y las Células Presentadoras de antígeno (APC). Estos procesos son de vital importancia para la regulación de la respuesta inmunológica en enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En este sentido, se han estudiado in vivo los procesos de infiltración e interacciones de las células inmunes en los focos inflamatorios en modelos animales. Se ha identificado una nueva subpoblación de macrófagos perivasculares que actúan como auditores de antígenos que capturan por vía sanguínea para mantener la memoria inmunológica de linfocitos T en los tejidos periféricos, como la piel. Las sinapsis constituyen una vía de comunicación muy evolucionada entre células pertenecientes a igual o distinto tejido, esenciales para la función de los sistemas nervioso e inmune. La sinapsis inmunológica (SI) es una estructura transitoria y muy específica que se forma por una profunda reorganización de receptores transmembrana y moléculas asociadas a la membrana, que quedan dispuestas en anillos concéntricos en la interfaz entre la célula T y la célula presentadora de antígeno (APC). Los citoesqueletos de actina y tubulina son movilizados rápidamente hacia la SI. La translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) conlleva la convergencia del Aparato de Golgi y sistema energético (mitocondrias) en las cercanías de la APC, sentando las bases para la secreción polarizada. Nuestro grupo investiga el control por la SI de la polaridad de los diferentes orgánulos celulares (ej. mitocondrias, Cuerpos Multivesiculares) y las consecuencias funcionales de la transferencia direccional de nanovesículas (exosomas) ricas en ARN desde las células T a las APC a través de la SI.

El 14 de noviembre, ingresó como Académico de Número el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón que fue contestado por el Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, Académico de Número de la RANF.

El Dr. Sentandreu es Doctor en Farmacia por las Universidad Complutense de Madrid y Doctor (Ph.D.) en Bioquímica por la Universidad de Cambridge (R.U.). Catedrático de Microbiología y Profesor Emérito de la Universidad de Valencia. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Ha obtenido los Premios Severo Ochoa y Alberto Sols. Ha dirigido 43 tesis doctórales y entre sus discípulos se encuentran 13 catedráticos de Universidad. Ha sido miembro de la Comisión Nacional de Microbiología y Parasitología del Consejo Nacional de Especializaciones Médicas, de la Comisión Nacional de Microbiología y Parasitología de Farmacéuticos Especialistas, de la Comisión "Antiinfecciosos" de la Real Farmacopea Española, del Plan de Biología Molecular y sus Aplicaciones de la Fundación Juan March, del "Collaborative Research Programmes" de la OTAN (Bruselas), etc. Ha participado como Investigador Principal en proyectos de investigación financiados por la Unión Europea, Ministerio de Educación y Ciencia, Generalitat Valenciana, Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, Diputación de Valencia y empresas privadas. Ha publicado 27 capítulos de revisión en libros de la especialidad y más de 170 artículos en revistas internacionales.

Su discurso de ingreso versó sobre: "La Piedra de Rossetta de la Biología y su impacto en la Farmacia".

La Piedra de Rossetta de la Biología y su impacto en la Farmacia. Las ciencias biológicas, y en especial la Genética, han experimentado un desarrollo espectacular, que han hecho avanzar de una manera considerable el conocimiento de los mecanismos por los que se rigen las reacciones químicas que tienen lugar en el interior de las células y las leyes implicadas en los mecanismos de la herencia de los seres vivos. Estos conocimientos son explotados por la industria farmacéutica en la "construcción" de microorganismos capaces de actuar como fabricas para la síntesis de todo tipo de sustancias química pero nos centraremos en la obtención de sustancias de interés farmacológico (hormonas, vacunas,...). Veremos también los factores que afectan la actividad de los fármacos como así mismo las bases racionales para su diseño personalizado, los productos terapéuticos producidos por los microrganismos directamente en el hombre (microbioma) como así mismo la importancia de los alimentos funcionales. Se expondrá la utilización de moléculas de ADN como productos farmacológicos (terapia génica) y finalmente se comentaran los problemas técnicos y éticos que se derivan del desarrollo de la terapia génica utilizando células germinales y cigotos y se debatirá la posición de la Sociedad ante la genética del Homo sapiens.

El 21 de noviembre, la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF celebraron en la sede de la RANF la Mesa Redonda sobre: "Garantía de Continuidad Asistencial. Plan terapéutico". Fue presentada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez, Vicepresidente de la RANF y por el Dr. D. José Luis Poveda, Presidente de la SEFH; contó con las

ponencias del Excmo. Sr. D. N. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número de la RANF y del Dr. Ramón Orueta Sánchez, Médico de Familia.

El 28 de noviembre, la Real Academia Nacional de Farmacia, la Real Academia Nacional de Medicina y la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales celebraron por primera vez la Sesión Científica Extraordinaria conjunta, que tuvo lugar en la sede de la RANM sobre: "Criterios Actuales sobre Virología en el VIH /SIDA". En el marco de la conmemoración del Día Mundial del SIDA. Actuaron como ponentes los Excmos. Sres. D. Esteban Domingo Solans, Académico de Número Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales: "La diversificación del VIH como barrera al control del SIDA"; Excma. Sra. D.ª María del Carmen Maroto Número de Vela, Académica de la Real Academia Nacional Medicina: "Recientes investigaciones en el campo del diagnóstico v tratamiento de la infección por VIH" y el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Académico de Número y Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia: "Vacunas VIH/SIDA: Dónde estamos"

Desde el año 1984 en que empezaron a aparecer casos de una nueva enfermedad, los avances científicos sobre el virus responsable, el VIH, han sido numerosos. Por ello, y con motivo del Día Mundial del SIDA, las Reales Academias de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, de Medicina y de Farmacia, han decidido realizar una Sesión Extraordinaria sobre los diferentes problemas y soluciones que se plantean en el momento actual.

Una de las barreras al control del SIDA es la capacidad de variación genética del virus, y dicha variación se debe a propiedades de su maquinaria replicativa con una retrotranscriptasa inversa propensa a producir mutaciones y formas recombinantes. La diversificación ha sido continua desde la introducción de virus simios en la especie humana. Además de la capacidad adaptativa, la naturaleza retroviral del VIH permite mantener el DNA vírico de forma latente en células del sistema inmune humano, lo que representa una dificultad para la eliminación del virus. En este momento, existen nuevas perspectivas para conseguir una inhibición más eficaz en su replicación. Desde el punto de vista diagnóstico se dispone de métodos de gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico precoz, y las modernas técnicas de biología molecular nos permiten buscar el RNA del virus y, además, detectar cargas víricas en límites tan pequeños, que nos plantean nuevos retos diagnósticos. El amplio arsenal terapéutico, la posibilidad de administración de dosis únicas, el estudio de mutaciones y resistencias, pero

sobre todo, el diagnóstico precoz, nos ayudará a disminuir el elevado número de casos infectados pero no diagnosticados, que constituye la verdadera causa del mantenimiento de la infección y la dificultad de su control. Por todo ello, dicho control y la eventual erradicación del proceso infeccioso, sólo podremos conseguirlo a partir de la existencia de una vacuna eficaz. Actualmente los diferentes intentos de vacunación empleados en los ensayos clínicos de eficacia en fases IIb/III han fracasado, y sólo un ensayo en fase III ha demostrado una eficacia limitada del 31.2%. S e están desarrollando nuevos candidatos vacunales, algunos de los cuales han entrado en fases clínicas con buenos resultados inmunológicos. En esta Sesión se han presentado nuevos prototipos vacunales, así como los ensayos clínicos que están en marcha, con la esperanza de que puedan ser utilizados de forma efectiva. En definitiva, creemos que en este foro de debate, y gracias a la participación de los ponentes de las tres Corporaciones, se ha profundizado en la adquisición de nuevos conocimientos que ayudarán al control de la infección por el VIH-SIDA.

El 5 de diciembre tuvo lugar el Acto de Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia de la Dra. María Blasco, Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas que pronunció la conferencia titulada: "Telómeros: Una de las claves del cáncer y del envejecimiento" y que fue presentada por la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto

María A. Blasco (Alicante, 1965) obtained her PhD in 1993 for her research at the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" under the supervision of M. Salas. That same year, Blasco joined the Cold Spring Harbor Laboratory in New York (USA) as a Postdoctoral Fellow under the leadership of C. W. Greider. In 1997 she returned to Spain to start her own research Group at the Centro Nacional de Biotecnología in Madrid. She joined the CNIO in 2003 as Director of the Molecular Oncology Programme and Leader of the Telomeres and Telomerase Group and was appointed CNIO Vice Director in 2005. Her major research achievements include: (1) Isolation of the core components of mouse telomerase and generation of the first knockout mouse for telomerase; (2) Generation of the first mouse with increased telomerase expression in adult tissues; (3) The finding that mammalian telomeres and subtelomeres have epigenetic marks characteristic of constitutive heterochromatin; (4) Discovery of telomeric RNAs, which are potent telomerase-inhibitors whose expression is altered in cancer; (5)

Demonstration that telomerase activity and telomere length determine the regenerative capacity of adult stem cells; (6) Identification of the longest telomeres as a universal feature of adult stem cell niches; (7) The finding that telomerase overexpression in the context of cancer resistant-mice improves organismal fitness, produces a systemic delay in ageing and an extension in median life-span; (8) Discovery that telomeres rejuvenate after nuclear reprogramming; (9) Identification of the molecular mechanisms by which short telomeres/DNA damage limit nuclear reprogramming of defective cells; (10) Discovery that telomeric protein TRF1 can act as both a tumour suppressor and as a factor in ageing prevention. Blasco has received the Josef Steiner Cancer Research, Rey Jaime I, Körber European Science, Alberto Sols and Fundación Lilly Preclinical Research, Awards. She has also been the recipient of the Spanish National "Santiago Ramón y Cajal" Research Award in Biology (2010). Blasco has also been awarded the EMBO Gold Medal and has served on its Council since 2008.

El 11 de diciembre se celebró la conferencia impartida por el Dr. Antonio Sánchez Pozo, Coordinador para la región sur de Europa del proyecto PHAR-QA y Profesor de la Universidad de Granada, sobre: "Competencias futuras del farmacéutico y su formación en el ámbito de la Unión Europea".

El proyecto PHAR-QA es un proyecto de la Unión Europea dentro del programa ERASMUS Lifelong Learning para desarrollar las competencias del farmacéutico y el sistema de calidad que garantice su formación en todos los países europeos. Las competencias del farmacéutico necesitan ser redefinidas en base a los cambios habidos en los sistemas de salud y en las ciencias farmacéuticas. La formación debe responder a esas competencias en los niveles de grado, master y doctorado y el establecimiento de sistemas de aseguramiento de la calidad en esa formación es esencial para garantizar la seguridad y el bienestar del paciente, que si no lo somos, lo seremos todos. Una mejor definición de las competencias llevará a un mayor reconocimiento del papel del farmacéutico en la farmacia comunitaria, en los hospitales, en la industria, en la investigación y desarrollo, y cualquiera de las muchas facetas profesionales en las que puede y debe estar presente como garante de medicamentos eficaces y seguros para todos.

El 12 de diciembre tuvo lugar la Sesión Científica Conmemorativa de los Premios Nobel 2013 en Fisiología o Medicina y en Química. La presentación fue a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la RANF; EL PREMIO NOBEL 2013 EN FISIOLOGÍA O MEDICINA contó con la intervención de D.

José Antonio Esteban García, Profesor de Investigación del CSIC y Director del Departamento de Neurobiología el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM): "Del tráfico de membrana a la comunicación neuronal y las enfermedades mentales". EL PREMIO NOBEL 2013 EN QUÍMICA contó con la intervención de Dª. Beatriz de Pascual-Teresa Fernández, Catedrática de Química Orgánica y Decana de la Facultad de Farmacia en la Universidad San Pablo-CEU, Madrid: "Combinación de métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica para entender y predecir procesos químicos complejos".

En cuanto a las noticias y distinciones que han recibido nuestros Académicos durante este último trimestre, hay que destacar:

El trimestre comenzó con la triste noticia del fallecimiento de nuestro querido compañero el Excmo. Sr. D. Miguel Rubio Huertos. Descanse en Paz.

El **2 de Octubre** la Real Academia Nacional de Farmacia albergó en su sede la presentación del Libro: "Enfermedad Metastásica Ósea: carga de enfermedad, tratamiento y consumo de recursos". el Acto estuvo presidido por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban, Presidente de la Corporación.

La enfermedad metastásica ósea (EMO) ocasiona un importante consumo de recursos sanitarios. Más de la mitad de sus costes provienen de la hospitalización, ya que aumenta notablemente su estancia media (Delea 2006, Pockett 2010). En Estados Unidos se observa un coste medio de más del doble del esperado en ausencia de metástasis óseas (Schulman 2007). Los costes medios de los eventos óseos son muy similares en los países europeos.

Los expertos que participaron en los grupos de discusión llegaron a un acuerdo pleno en cuanto al severo impacto que tiene la EMO en los pacientes y en la sociedad. Surgieron algunas puntualizaciones en cuanto a la eficacia, tolerabilidad y facilidad de uso del nuevo medicamento para su incorporación al Sistema Nacional de Salud. Las limitaciones se focalizan en la diferente forma de interpretar los resultados en salud y el poco valor que se da a las evaluaciones económicas aplicables (estudios de coste-efectividad y de coste-utilidad), en contraposición con la importancia que se le da a los estudios de costes incrementales y de impacto presupuestario del nuevo fármaco.

Un acceso más fácil al paciente de la mejor medicación requiere de la participación de los diferentes agentes en las decisiones. La elaboración y difusión de los informes de posicionamiento terapéutico facilitarán la homogeneización de criterios, siempre y cuando haya un acuerdo definitivo de su carácter vinculante para todas las Comunidades y se conozca en qué medida influirá la evaluación económica en el dictamen final.

El 2 de Octubre el periódico El País entrevistó al eminente profesor José María Ordovás acerca de NUTRICIÓN Y ADN,

El 9 de Octubre la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, Académica de Número de esta Real Institución concedió una entrevista a mi+d.

El Rey recibió el martes **23 Octubre 2013** a los presidentes de las Reales Academias con motivo de la apertura del curso en una audiencia inusual en el Palacio de la Zarzuela, motivada por la convalecencia del jefe del Estado, que se recupera de su última operación de cadera.

Tradicionalmente los Reyes presidían por estas fechas el acto de apertura del curso en alguna de las ocho sedes de las Reales Academias de ámbito nacional, de forma rotatoria.

Este año tocaba celebrar el acto en la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando, en la calle Alcalá de Madrid, pero la recuperación de S.M., motivó la sustitución del acto, en el que solía pronunciar unas palabras, por una audiencia en Zarzuela a los presidentes de las RR.AA.

De las ocho academias, acudieron los presidentes o directores de las Reales Academias de Bellas Artes de San Fernando, Antonio Bonet; Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Alberto Galindo; Ciencias Morales y Políticas, Marcelino Oreja; Farmacia, Mariano Esteban, y Medicina, Joaquín Poch, acompañados por el secretario general del Instituto de España, Pedro García Barreno.

En la madrugada del 29 Octubre 2013 falleció el Excmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro, Secretario de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y Académico Correspondiente de la RANF. Desde 2006 Presidente del Casino de Madrid.

El fin de semana del 21-23 de noviembre, varios Académicos de Número y correspondientes de la RANF asistimos, por invitación de nuestro Académico Correspondiente Dr. Pedro Guillén García, Director de la CLÍNICA CEMTRO, al XII SYMPOSIO INTERNACIONAL. Ha tratado sobre "Avances y actualizaciones en Traumatología y Ortopedia" del 21 al 23 de noviembre 2013, en el que han intervenido eminentes personalidades científicas, españolas, de EE.UU. y Méjico. Entre ellas el Prof. Thomas Vangsness, de UCLA, y Prof. Steve Abelow de Lake Tahoe. y nuestro compañero Acad. Dr. Guillermo Giménez Gallego. Se han expuesto los grandes avances en prótesis articulares de ambos miembros. La mitad de las sesiones se dedicaron a la investigación, al significado de la célula como medicamento. La célula administrado convenientemente en cultivos autólogos, es una oportunidad terapéutica para las patologíad el sistema músculo esquelético. Se han desarrollado talleres de artroscopia sin cables y cultivos celulares específicos de condrocitos y mioblastos.

Felicitamos a nuestro Acad. Correspondiente Pedro Guillén García por los cuantiosos medios puestos a disposición para el desarrollo de la ciencia en beneficio de la humanidad.

El 12 de diciembre de 2013 en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia, la RANF con sus representantes D. Mariano Esteban, presidente, y D. Bartolomé Ribas, académico secretario, se firmó el Convenio Marco de Colaboración con la Universidad Francisco de Vitoria, representada por D. Fernando Caro.

El 19 de diciembre resultaron elegidos, en las correspondientes Juntas Generales extraordinarias: el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena como nuevo Vicepresidente, el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz, como nuevo Vicesecretario y el Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just, como nuevo Académico de Número Electo, medalla nº 36, de la corporación.

ANÁLISIS DE LIBROS



Antonio González Bueno

Académico Correspondiente. Editor asociado.
e-mail: edicion@ranf.com

Doadrio Villarejo, Antonio L. *NOx, COV y CFC: química de formación y destrucción del ozono atmosférico*. [Lecturas singulares, 12]. Madrid. Real Academia Nacional de Farmacia, 2013. 144 págs. ISBN: 978-84-940609-8-4

Los procesos de formación y destrucción de ozono –y los peligros que esta sustancia supone para la salud humana- es el tema nuclear que Antonio L. Doadrio Villarejo aborda en este estudio. El texto se organiza en dos bloques: el primero dedicado a la formación de ozono troposférico y el segundo a la destrucción del ozono estratosférico.

El texto comienza con una somera presentación del ozono: la estructura de su molécula, sus propiedades físicas y químicas, los procesos de obtención y sus efectos sobre la salud humana. Cobran luego protagonismo los contaminantes primarios que intervienen en la producción del ozono troposférico: los NOx (monóxidos y dióxidos de nitrógeno) y los COV (compuestos orgánicos volátiles); a los primeros dedica una especial atención, no en vano el monóxido de nitrógeno actúa –si bien de manera limitada- como moderador del ozono troposférico. Un último epígrafe se ocupa del ciclo fotocatalítico que conduce a la formación de ozono a partir de NOx y COV y su implicación en la generación de las nieblas fotoquímicas ('smog'), justificando su evolución estacional y diaria, en función de las condiciones de insolación y disponibilidad de contaminantes primarios en la atmósfera.

En el segundo bloque, el dedicado a los procesos de destrucción del ozono estratosférico, el protagonismo se reserva para los CFC (clorofluorocarbonos) y las razones de su presencia en la estratosfera. Un análisis sobre la actividad protectora de la capa de ozono estratosférica frente a las radiaciones UV solares y los sistemas de medida de su amplitud, junto a la descripción del denominado 'ciclo natural' del ozono, sirven de base al autor para afrontar el problema de la 'salud de la capa de ozono' ('el agujero de ozono') y analizar, siguiendo las propuestas del

mexicano José Mario Molina-Pasquel Henríquez (n. 1943) y del estadounidense Frank Sherwood Rowland (1927-2012), la responsabilidad de los CFC en la disminución de la capa de ozono estratosférica, unas investigaciones por la que estos investigadores obtuvieron, junto al químico holandés Jozef Crutzen (n. 1933), el premio Nobel de química en 1995. La mayor destrucción del ozono estratosférico se produce en el continente antártico: sus especiales condiciones climatológicas -en particular la formación de nubes estratosféricas polares y del vórtice antártico- son razón de ello, y por eso ha sido este espacio geográfico al que más atención han dedicado los investigadores; no obstante estas condiciones climáticas no son generalizables al resto de la Tierra, por lo que el 'modelo antártico' -con sus particulares situaciones de fotolisis primaverales- no es generalizable. Como complemento al 'modelo antártico', el texto ofrece una visión general de los ciclos implicados en la destrucción del ozono estratosférico, tanto naturales como antropogénicos; se ocupa de los 'microagujeros' que ocurren en otras latitudes –entre ellos en España- y de las condiciones especiales que suceden en el Ártico. Los dos epígrafes finales abordan los principales logros en la lucha contra la destrucción de la capa de ozono, desde 1840 hasta nuestros días; y las lesiones cutáneas y sistémicas producidas por las radiaciones ultravioletas en el organismo humano.

La bibliografía final incluye –además de obra impresa- una extensa selección de páginas web, algunas con actualización periódica, lo que permite al lector disponer de datos renovados –con acceso directo desde las versiones en *ebook*- sobre los niveles de contaminación por ozono y estimaciones sobre las concentraciones de NOx y otros contaminantes en el medio ambiente.

En definitiva, una adecuada 'puesta al día' de la información disponible sobre el problema de la formación y destrucción del ozono, construida en un lenguaje claro, ampliamente ilustrada, que nos permite acceder a una visión general sobre la incidencia de esta sustancia en nuestra salud y comprender mejor las situaciones que los ciclos de su formación / destrucción suponen para un medio ambiente global.



PUBLICACIONES ELECTRÓNCAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA