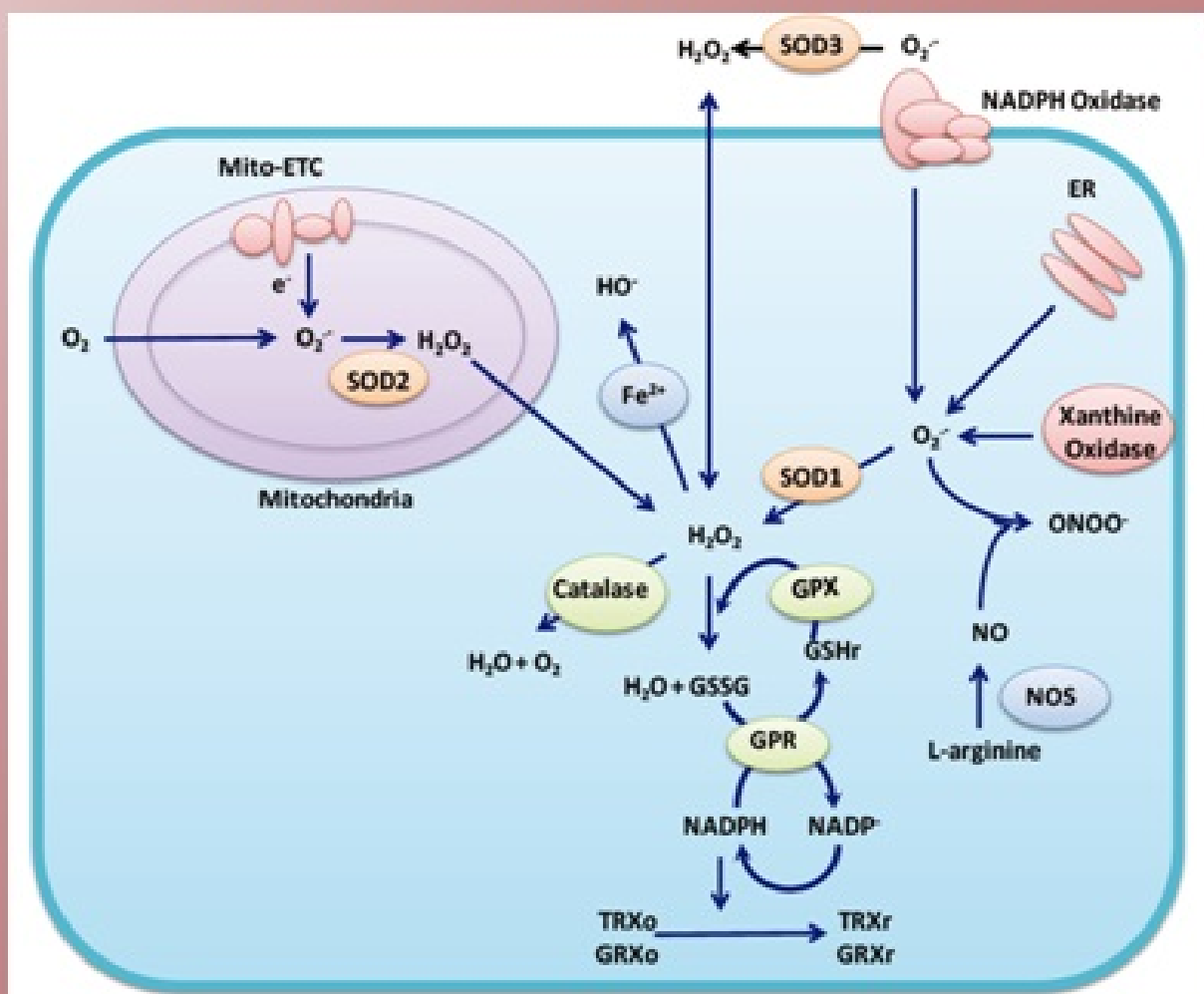


ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 81 | Número 2 | Abril-Junio 2015 |



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA
NACIONAL DE
FARMACIA



Instituto
De España



Ministerio de
Educación Cultura
y Deporte



Problems associated with the emission of pharmaceutical products to the environment

Title in Spanish: *Problemática de la emisión de productos farmacéuticos al medio ambiente*

Francisco Díaz-Fierros Viqueira¹

¹Catedrático Emérito de la Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia, Departamento de Edafología e Química Agrícola

ABSTRACT: This review study considers the problems associated with the presence of human and veterinary pharmaceuticals in the environment since the 1980s and emphasizes the most important publications and legislation. The activities generating these products (the pharmaceutical industry, human and veterinary use and disposal and depuration processes) are outlined and the main routes of entry to the environment are identified. Data on the maximum concentrations of pharmaceuticals in waters, sediments and soils are presented, along with some examples of Spanish studies. The effects on man and on ecosystems are analysed and the methods most commonly used to evaluate health risks are described. Finally, measures of minimizing the risks and the extent to which pharmaceutical monitoring can address this problem are considered.

RESUMEN: Se realiza una introducción a la problemática de la presencia de medicamentos de uso humano y veterinarios en el medio ambiente desde la década de los ochenta del pasado siglo hasta la actualidad, destacando las publicaciones y normas legislativas más importantes. Se analizan las actividades que generan estos productos (industria farmacéutica, consumo humano y animal y procesos de vertido y depuración) así como su principales vías de transporte en el medio. Se presentan datos de la concentraciones máximas de medicamentos en aguas, sedimentos y suelos, así como algunos ejemplos de estudios españoles. Se analizan los efectos sobre el hombre y los ecosistemas y se describen los métodos más utilizados para la evaluación de los riesgos sanitarios. Finalmente, se consideran las medidas de atenuación de los riesgos y en qué medida la farmacovigilancia puede tener en cuenta esta problemática.

*Corresponding Author: francisco.diaz-fierros@usc.es

Received: February 3, 2015 Accepted: February 24, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 86-102

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

En el año 1998, Bent Halling-Sorensen, con otros profesores de la Royal Danish School of Pharmacy de Copenhagen publicaba el trabajo "Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A review" (*Chemosphere*, vol. 36, no. 2 : 357-393).. En él se presentaba por primera vez una amplia revisión sobre la presencia de productos farmacéuticos en el agua, sedimentos, suelos y los diferentes componentes de la cadena alimentaria, como consecuencia de actividades relacionadas con la sanidad humana y animal.

Los primeros trabajos considerados en la citada revisión fueron los relativos a los medicamentos veterinarios (antibióticos, farmacoquímicos, parasiticidas, aditivos alimentarios y promotores del crecimiento) y sobre alguno de los cuales Coats, JR et al. (1) ya habían realizado una primera evaluación sobre los factores que incidían sobre su bioacumulación. En esta primera serie de trabajos también habría que considerar los realizados sobre el parasiticida ivermectin (2, 3). Igualmente los medicamentos y aditivos empleados en acuicultura fueron

también objeto de consideración como posibles contaminantes de aguas y sedimentos, como los realizados en los países nórdicos por Jacobsen, P y Berghind, L. (4), Björklund, H. et al. (5), Ervik, A. et al (6) o la revisión de Schneider, J. (7).

En relación con los medicamentos de uso humano fue en la década de los ochenta cuando comenzaron a publicarse los primeros trabajos sobre su presencia en el agua o en los efluentes de las EDARs como los de Watts et al (8), sobre antibióticos, o los Aherne et al. (9) sobre antineoplásicos en aguas de ríos. La revisión de Richardson, ML y Bowron, JM (10) sobre la presencia de analgésicos, hipnóticos, estimulantes sicomotores y sobre el clofibrato y sus derivados, en aguas y efluentes, representó uno de los primeros análisis sobre un conjunto de medicamentos humanos. Asimismo los trabajos de Stumpf et al. (11) sobre analgésicos y ácido clofibrato en efluentes y, sobre todo, el de Gartiser, SL et al. (12) y de Guiliana F. et al. (13) sobre efluentes de centros hospitalarios completaron la información obtenida durante este período.

Halling-Sorensen, B. et al., en su revisión, señalan, de todas formas, que “se conoce muy poco sobre las rutas de exposición de los medicamentos” y en relación con los de uso humano “su conocimiento es prácticamente cero” por lo que, finalmente, concluyen, que “son necesarias nuevas investigaciones en este escasamente explorado campo para evaluar el riesgo ambiental que supone la exposición a las substancias medicamentosas”.

Los últimos años del siglo XX fueron definitivos para situar a los medicamentos como un objetivo importante en los estudios sobre los riesgos ambientales. Además de la revisión citada, tuvieron gran trascendencia científica el trabajo del danés Christensen (14) con el estudio sobre los riesgos humanos de un estrógeno (EE2), un antibiótico (Pen V) y un antineoplásico (CP), de los que concluía que sus riesgos eran despreciables en cuanto a su repercusión sobre los seres humanos. En 1999 tiene lugar en Freiburg (Alemania), auspiciado por la European Science Foundation (ESF) un workshop sobre “Pharmaceuticals in the Environment” cuyas aportaciones darían lugar a una publicación con el mismo nombre coordinada por Klaus Krümmerer del Departamento de Ciencias Sanitarias ambientales de la Universidad Central Médica de Freiburg. Este libro, editado en el 2001, lleva ya dos reediciones, 2004 y 2008 (15) y es una de las publicaciones de referencia sobre esta problemática. La Environment Agency británica, en el año 2000, frente al creciente interés de esta problemática tanto de las instancias científicas como en la prensa popular, publica también una amplia revisión sobre esta temática (16).

La parte fundamental de todos estos estudios se había realizado en Europa, sobre todo en Alemania y en menor medida en Suiza y Dinamarca. En USA, de todas formas estas investigaciones y preocupaciones comenzarían a plantearse a partir del año 2001 en el que la American Chemical Society organiza un simposio sobre “Pharmaceutical and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues” cuyas aportaciones publicaría poco después (17). La inclusión también, tal como ocurría en este simposio, de los cosméticos, junto a los productos farmacéuticos de usos humano y animal, que definirían por las siglas PPCP, sería una de las características de los trabajos americanos.

Después de estos tres libros, serían publicados también en los años siguientes: *Hot Spots Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment*, Dietrich, D.R. et al., 2005 (18), *Occurrence Survey of Pharmaceutically Active Compounds*, ANWA, 2005 (19), *Human Pharmaceuticals: Assessing Impacts on Aquatic Ecosystems*, Williams, R.T, ed., 2005 (20), *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances*, Ternes, Th.A. y Joss, A, 2006 (21), *Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle*, Petrovic, M y Barceló, D. eds., 2013 (22), *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Plants*, Aga, D. 2008 (23), *An introduction to Environmental Pharmacology*, Rahman, S.Z. et al. 2008 (24), *Veterinary Medicines in the Environmental*, Crane, M. et al., 2009 (25), *Green and*

Sustainable Pharmacy, Kummerer, K. ed. 2010 (26), *Pharmaceuticals in the Environment: Current knowledge and need assessment to reduce presence and impact*, Roig, B. ed. 2010 (27), *Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives*, Brooks, Th.A y Huggett, DB, eds. 2012 (28) y *Study on the environmental risks of medicinal products*. BIO Intelligence Service, 2013 (29).

Se puede decir, a la vista de estas publicaciones en formato libro, y de otras muchas (que se acercan al millar) en revistas especializadas, que esta temática ha suscitado en muy pocos años un interés amplio y creciente en los medios científicos. También, la opinión pública, a través de los medios de comunicación de masas, se fue haciendo eco, y no siempre de la forma más acertada, de esta nueva problemática ambiental. Episodios como el envenenamiento masivo de buitres en Pakistán por diclofenaco presente en carroña procedente de animales tratados con este fármaco (30) fue posiblemente uno de los más comentados. También las alteraciones sexuales de peces e invertebrados acuáticos por la presencia de hormonas en el agua así como otras hipótesis, no suficientemente testadas, fueron objeto de activas campañas de difusión en los medios (31).

En España, los primeros estudios sobre esta temática fueron realizados por Damia Barceló y su equipo del CSIC de Barcelona sobre la estrogenicidad en aguas residuales y fluviales (32), seguido por la presencia de disruptores endocrinos en aguas residuales, fluviales y sedimentos (33), así como por la presencia y eliminación de sustancias farmacéuticas en aguas residuales y de bebida (34). En la actualidad, Barceló es director del Instituto de investigación del agua de Cataluña (ICRA) y recibió, entre otros, los premios Jaime I y el sueco Recipharm Environmental Award por sus estudios sobre métodos de análisis y presencia de medicamentos en aguas. Otros trabajos importantes realizados en España fueron los de Lema, J.M. y su equipo en la Universidad de Santiago de Compostela, desde el año 2004, sobre la presencia de productos farmacéuticos en aguas residuales y sus métodos de eliminación (35-37), Alonso, E. y su equipo en la Universidad de Sevilla, desde 2007, estudian también la presencia de medicamentos en aguas residuales pero considerando también sus consecuencias mediante el análisis de riesgos, como el realizado en Sevilla y Doñana (38, 39). Otros centros de estudios españoles, en general de ingeniería química o análisis químico, publicaron trabajos sobre esta temática, como Benítez, J et al. (40) en Extremadura, Ibáñez, M. et al. (41) en Castellón, Gil García, M.D. et al. (42) en Almería, Rosal, R. et al. (43) en Alcalá, o los catalanes Matamoros, V. et al. (44) del CSIC-Barcelona, Méndez-Arriaga, F. et al. (45) de la Universidad de Barcelona, Ventura, E. et al. (46) de AGBAR o Nieto, A. et al. (47) de la Universidad Rovira i Virgili.

Como consecuencia de estos estudios y preocupaciones la legislación ambiental también se ocupó de la regulación de estos productos. En la UE una norma específica sobre

los riesgos ambientales de los medicamentos comenzó con los de uso veterinario regulados, desde 1997, por la guía EMEA/CVMP/055/96 (48). Estos documentos aun cuando no suponen una obligación legal de cumplimiento, en general son seguidos por las partes implicadas. Esta guía, posteriormente fue reemplazada por un documento armonizado trilateralmente para UE, USA y Japón (49, 50) ampliado por un nuevo documento, en el año 2007 (51). Con relación a los medicamentos de uso humano, después de catorce años de trabajo y negociaciones con las partes, se publicó finalmente la correspondiente Guía en el 2006 (52). Una diferencia substancial que se establece en la UE entre los medicamentos de usos animal y humano en relación con su evaluación de impacto ambiental es que para los primeros, se precisa de forma taxativa una evaluación positiva para su comercialización, mientras que para los segundos los riesgos ambientales deben siempre evaluarse en comparación con los beneficios sanitarios esperados.

En USA, la FDA no comenzó a recomendarle a las compañías farmacéuticas evaluaciones ambientales hasta la década de los ochenta, pero hasta el año 1998 no publicó su primer documento de referencia, *Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biological Applications* (53). Esta guía, aunque recoge el pensamiento de la FDA sobre esta problemática, solo se debe considerar como un conjunto de sugerencias o recomendaciones que, en general, son aceptadas por las partes. Esta guía sigue vigente, aunque periódicamente se publiquen documentos complementarios como el relativo a la terapia génica del año 2006 o el, actualmente en discusión por las partes, sobre terapia génica, vacunas vectoriales y virus recombinantes. Para los medicamentos de uso veterinario se consideran las guías VICH, armonizadas internacionalmente, como los documentos de

referencia.

2. CONSUMO DE MEDICAMENTOS PARA USO HUMANO Y VETERINARIO.

Aunque las estadísticas de utilización de medicamentos a nivel mundial presentan muchas deficiencias Kümmerer (2004) estima en torno a las 100.000 toneladas-año las utilizadas para uso humano con un promedio de 15 gr. cap⁻¹.año⁻¹. Para países industrializados como USA y Suiza, estos promedios se incrementan hasta los 50-150 g.cap⁻¹.año⁻¹, llegando incluso a los 450 g.cap⁻¹. año⁻¹ como es el caso de Alemania (54). Estas cifras sobre el consumo global de medicamentos se vinieron repitiendo en sucesivos estudios (55, 56) a pesar de que el volumen de ventas de los fabricantes casi se duplicó en el período (2002-2012), con un incremento del 88% en valores monetarios constantes (57). Si se tiene en cuenta que en dicho período apenas aumentó el precio global de los medicamentos como consecuencia de la comercialización masiva de genéricos, la producción, mundial probablemente, superaría, en realidad, las 150.000 toneladas-año. USA es el principal consumidor, con el 55%, seguido de la UE, con el 24% y Japón, con el 14% (58). El resto del mundo consumiría el restante 7%. Por otra parte, esta producción está diversificada entre una gran variedad de productos que se sitúa, a nivel mundial, en torno a los 4.000 (59).

Para determinados países europeos existen estadísticas parciales como las aportadas por el proyecto UE-POSEIDON (Assesment of technologies for removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities), algunos de cuyos datos se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1. Consumo anual (en kg.) de algunos medicamentos en países europeos (Alder, AC. *et al.*, 2006).

	Francia (1998)	Alemania (2001)	España (2003)	Suecia (2005)
Población (millones)	8.0	58.5	43.2	9.0
Diclofenaco	14.900	49.000	32.300	3.383
Ibuprofeno	166.200	128.000	276.100	70.779
Bezafibrato	34.500	26.000	-- -- --	600
Diazepam	400	440	900	178
Carbamazepina	35.200	78.000	20.000	7.382
Roxitromicina	9.300	6.200	300	14
Sulfametoxazol	22.400	47.000	12.700	1.444
Iopromida	73.400	130.000	-- -- --	-- -- --

De los diferentes tipos de medicamentos, en la UE, los más consumidos son los antihipertensivos y analgésicos, seguidos por los psicoactivos, los hipolipemiantes y antidiabéticos. Finalmente vendrían los antibióticos. Francia sería el Estado Miembro con mayor consumo de estos diferentes tipos de medicamentos excepto en el caso de los antihipertensivos, donde sería UK el máximo

consumidor. (61).

Para España, el estudio de Simó Miñana, J., 2012 (62), utilizando como referencia las dosis diarias definidas (DDD) encuentra que el consumo español de los diferentes grupos terapéuticos se encuentra próximo a la media de los 22 países europeos considerados, exceptuando el caso de los antiulcerosos, ansiolíticos y vasodilatadores “que

superan notablemente el promedio del grupo”. De todas formas, como señala Le Pen, C. et al., 2007 (63), las DDD recomendadas por la OMS para las estadísticas de consumo de medicamentos no tienen una equivalencia directa en relación con la cantidad en peso empleada, que sería la que tendría mayores implicaciones ambientales. Como señala el citado investigador las comparaciones entre países “son sensibles a la elección del indicador de medida” por lo que el uso de las DDD, desde el punto de vista de los efectos del uso de los medicamentos sobre el medio, tendrían solo un valor orientativo.

El uso veterinario de medicamentos, en general, es menos importante que en el caso de los humanos, sin embargo hay determinados grupos como los antimicrobianos, donde su utilización puede llegar a ser equivalente, como ocurría en la UE al comienzo de los 90. Posteriormente, con la disminución del uso de estos productos como promotores del crecimiento animal su porcentaje ha ido disminuyendo progresivamente. No ocurre lo mismo en USA, donde su utilización sigue estando entre el 50-70% del total (64). Para la UE, la ESVAC, proporciona desde el 2010 estadísticas detalladas, por países, sobre su uso. Para el año 2011 los 25 miembros producen un total de 8426 toneladas de antimicrobianos para uso veterinario, correspondiendo la máxima cantidad a Alemania con 1819 toneladas, seguida de España con 1779, Italia con 1663 y Francia con 896. Estas cantidades distribuidas por las unidades corregidas de población animal de cada país (PCU) nos indicarían que Italia es el país que utiliza dosis promedio más altas, con 370 mg./CPU, seguido de España con 249, Francia con 211 y Alemania con 117.

En acuicultura están también autorizados el uso de determinados medicamentos y, aunque las estadísticas son escasas, los datos de Noruega y el Reino Unido para el años 2006 (65) nos muestran valores significativos (antibióticos: 340 kg. Nw y 5.500 kg. UK, microbicidas y parasiticidas: 132 kg. Nw y 26.5 kg. UK).

3. ORIGEN Y VÍAS DE TRANSPORTE DE LOS MEDICAMENTOS AL MEDIO AMBIENTE

Las actividades que fueron detectadas como focos de emisión de estos posibles contaminantes fueron: la industria farmacéutica, el consumo y excreción por los seres humanos y los animales y los diferentes sistemas de tratamientos de residuos sólidos y aguas.

Los procesos de fabricación de medicamentos fueron considerados en general como focos menores de emisión como consecuencia de las rígidas medidas de control que presentan éstas actividades en regiones como la UE y USA, donde la implantación de las Buenas Prácticas de Fabricación limitó al mínimo las pérdidas de estos productos. Por otra parte, el alto valor económico de los APIs contribuyó también a que estas prácticas de control tuvieran una alta aceptación. Existen, sin embargo, algunos casos, citados por la bibliografía, de presencia de APIs con origen en la industria farmacéutica en ríos europeos como el Rhin (66) o en lagos, como el Lemán (67). Pero, sobre

todo, el caso más notorio ocurrió en la India, en donde un complejo industrial farmacéutico, próximo a Hyderabad, presentaba en sus aguas residuales diversos productos farmacéuticos en proporciones que llegaron a alcanzar, para el caso del ciprofloxacino, los 31 mg.l⁻¹ (68, 69), superiores a las dosis terapéuticas estimadas en los líquidos plasmáticos.

Para los seres humanos la vía fundamental de emisión de medicamentos se produce en la excreción por heces y orina. Aunque no se podría descartar el transporte de medicamentos de aplicación dérmica, como muchos antiinflamatorios, por la aguas residuales domésticas originadas por las actividades de higiene corporal (ducha y lavado). También Daughton, C.G. y Ruhoy, I.S., 2009 (70) consideran que el sudor puede ser otra vía significativa de eliminación. Entre los productos de excreción se encuentran las moléculas de los APIs, sin modificar, pero también un numeroso grupo de metabolitos, no siempre bien identificados, y que complica en extremo la valoración de los riesgos ambientales.

Las emisiones hospitalarias pueden representar una proporción significativa de estos productos. Para la UE se estiman en un 10% estas emisiones, si bien existen grandes variaciones según los países y tipos de productos, como ocurre p.e. en Dinamarca con los antibióticos, que representan el 24% del total. Por otra parte, hay un determinado tipo de medicamentos, como son los citostáticos y contrastes radiológicos que tienen prácticamente su uso restringido a los hospitales y cuyos porcentajes se sitúan sobre el 90% (71).

Los porcentajes de emisión del medicamento por las heces y orina son muy variables. Alder et al., 2006 (72) encuentra que la proporción emitida por heces y orina, incluidos los metabolitos, puede oscilar para un conjunto de 35 medicamentos desde casi el 100% de la claritromicina, gabapentina o ibuprofeno hasta el 5% del carisoprodol, o el 48% de la ranitidina. La mayor parte son excretados por la orina, aunque existen casos como la azitromicina, la eritromicina o el troglitazona, que lo hacen de forma mayoritaria por las heces.

En relación con la proporción de formas metabolizadas frente a las originales Lienert, 2007 (73), en un estudio sobre 212 APIs, encuentra que estas representan, en orina, el 42%, con una alta variabilidad que depende, en general, del producto considerado y, así, la amoxicilina es excretada por orina en su forma original en un 80-90%, mientras que la carbamazepina lo hace en un 3%. Como ocurre con otras toxinas que entran en el cuerpo humano, los medicamentos son metabolizados por una gran variedad de enzimas oxidativas y conjugativas que, en general, supone su transformación en moléculas más polares y solubles, que facilitan su eliminación (74). Este proceso ocurre en dos etapas: fase I, con oxidaciones, reducciones o hidrólisis, y fase II: con procesos de conjugación de los productos originales. Aunque se acepta, de forma genérica, que estos procesos metabólicos dan origen a una desactivación de los APIs, existe, sin embargo, una larga lista de metabolitos todavía

biológicamente activos como ocurre con los derivados de la carbamazepina y el diclofenaco (75). La norfluoxetina, un metabolito de la fluoxetina es 50% más ecotóxico que el producto original (76).

Los residuos de los medicamentos de uso humano se evacúan tradicionalmente por las aguas residuales (en las aguas “negras” para los de uso interno y, en las “grises”, para los de uso externo) o en los depósitos de residuos sólidos, a donde van a parar, tradicionalmente, los envases no usados o parcialmente utilizados, así como, en muchos casos, los lodos procedentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs). La eliminación de medicinas no utilizadas en los países industrializados muestran unos porcentajes alarmantes, que pueden alcanzar, p.e. en la UE, el 50% de los medicamentos vendidos (77).

Diferentes estudios demostraron que los sistemas habituales de tratamientos de aguas y de residuos sólidos (si exceptuamos el caso de la incineración) resultan insuficientes para la degradación, y consiguiente desactivación, de estos productos. Y, como consecuencia del proceso acumulativo que ocurre en estas estaciones o depósitos de tratamiento, sus efluentes pueden llegar a constituirse en los mayores focos de contaminación, por medicamentos, de las aguas subterráneas y superficiales y, secundariamente, de las aguas destinadas al consumo humano (78).

Los medicamentos utilizados para uso veterinario sufren un proceso de eliminación por heces y orina, semejante a los que ocurren en el ser humano. Los porcentajes de eliminación por una y otra vía, así como la presencia de numerosos metabolitos presentan proporciones similares, si bien en este caso hay que tener en cuenta como un nuevo factor de variabilidad, la especie animal considerada. A parte de los antibióticos y estrógenos, que pueden llegar a tener una especial incidencia en la medicina veterinaria, hay que considerar también el importante uso externo que se hace de sustancias parasiticidas o insecticidas, como es el caso de la piretrinas o piretroides para los animales de compañía.

En el caso de granjas con una gran concentración de animales pueden existir estaciones de tratamiento de efluentes a las que se les puede atribuir las mismas consideraciones que las utilizadas para los humanos. Sin embargo, en el caso de la ganadería productiva, la aplicación de los efluentes directamente al suelo o bien, indirectamente, a partir de los abonos orgánicos de origen ganadero, le confieren una particular singularidad. En estos casos es el suelo el receptor directo de estos residuos y, serán los procesos de degradación de sustancias orgánicas propios del sistema edáfico, los responsables de la inactivación, o no, de estos productos (79).

Finalmente, los productos medicinales utilizados en acuicultura, suponen una fuente directa y significativa de contaminación de las aguas superficiales y de los

sedimentos fluviales. Son sobre todo las granjas de salmónidos, por la intensidad de sus sistemas productivos, las que dieron lugar en Europa a los episodios de contaminación de aguas y sedimentos más señalados (80) Recientemente (81), también fueron detectados, en Escocia, medicamentos en sedimentos, procedentes de granjas marinas.

4. LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS, SUELOS Y SEDIMENTOS CON MEDICAMENTOS

Una de las recopilaciones más completas sobre la presencia de fármacos en las aguas es la realizada por Sadezky, A. *et al.*, 2010 (82). En ella, utilizando diferentes fuentes de información, recoge 58400 datos, de todo el mundo. La región que tiene una mayor presencia es la UE con el 74% de los datos, el continente americano, con USA y Canadá principalmente, el 22,7% y, el resto, correspondiente a China, Japón y Australia. De los estados, el que tiene un mayor conocimiento de este problema, con el 58% de las muestras totales, es Alemania. España presenta una situación intermedia, con 1434 muestras (el 2,4%) similar a la de UK, inferior a la de Francia, pero superior a la de Italia. En la Tabla 2, se presenta un resumen de esta información, representando solo el valor máximo encontrado en los diferentes análisis para cada fármaco. Esto nos daría una primera impresión sobre el peor horizonte posible en cuanto a la contaminación por fármacos de las aguas, que es un procedimiento habitual en la evaluación de riesgos sanitarios.

En esta recopilación no se tuvieron en cuenta los productos estrogénicos por entender sus autores que era muy difícil separarlos de los que tenían un origen natural. De todas formas revisiones posteriores como la de Aris, AZ *et al.*, 2014 (83) muestran que sus concentraciones máximas en aguas naturales, del orden de los 20-30 ng.l⁻¹ deberían dar origen a medidas de control de estos productos, como consecuencia de que, aún a esas bajas concentraciones, pueda existir la posibilidad de que se generen efectos ecotóxicos.

De los diferentes tipos de aguas consideradas, son las superficiales, con el 48,3% de los datos, las más analizadas, seguidas por los efluentes (25,7%) e influentes (7,4%) de las EDARs. El conocimiento sobre la presencia de fármacos en las aguas subterráneas, con el 11,7% de los datos, y sobre todo con las de bebida, con el 2,2%, y las marinas, con 1,9%, es muy inferior. Como era previsible son los influentes y efluentes de las EDARs los que presentan las cantidades más elevadas, con pocas diferencias entre ellos, lo que viene a confirmar la baja eficiencia de depuración de los procedimientos habituales de tratamiento de aguas residuales con relación a estos compuestos (84). Las aguas superficiales presentan valores inferiores, como consecuencia de los procesos.

Problems associated with the emission of pharmaceutical products to the environment

Tabla 2. Concentraciones máximas determinadas de productos farmacéuticos (en $\mu\text{g. l}^{-1}$) en el influente (EDAR_i) y el efluente (EDAR_e) de plantas depuradoras de agua residual, en aguas superficiales (AS), en aguas subterráneas (AP), en aguas de bebida (AB) y en aguas marinas (AM). (El número de muestras consideradas figura entre paréntesis. El número de países de los que se conocen datos corresponde a las tres primeras columnas) (85).

Fármaco	n° países	EDAR _i	EDAR _e	AS	AP	AB	AM
---------	-----------	-------------------	-------------------	----	----	----	----

Analgésicos

Ac. acetilsalicílico	4	(8)5.0	(129)1.51	(129)0.34	----	(62)0.001	---
Codeína	5	(34)3.37	(62)8.1	(110)0.094	(1)0.0	---	---
Diclofenaco	15	(249)28	(822)10.96	(1020)1.80	(154)0.93	(86)0.02	(44)0.101
Dimetilaminofenazona	3	(14)0.96	(92)1.0	(168)0.34	(33)0.4	(73)0.006	---
Fenopropeno	4	----	(147)5.4	(83)0.02	(7)0.0	----	----
Hidrocodona	3	(7)0.07	(46)0.40	(53)4.15	(1)0.0	----	----
Ibuprofeno	15	(217)1.68	(531)95	(1044)6.4	(112)0.0	(99)0.2	(60)0.025
Indometacina	7	(54)0.211	(300)0.6	(587)0.22	(88)0.0	(55)0.0	----
Ketoprofeno	9	(111)10.8	(435)2.10	(599)0.144	(96)0.0	(87)0.0	(46)0.0
Naproxeno	12	(154)611	(490)33.9	(712)4.5	(79)0.14	(23)0.0	(8)0.0
Paracetamol	9	(99)246	(162)11.3	(257)3.6	(44)0.0	(17)0.211	(8)0.214
Fenazona	5	(50)0.171	(303)0.9	(518)2.5	(159)3.95	(24)0.4	(44)0.188
Propifenazona	5	(34)0.85	(108)0.99	(345)0.88	(75)1.33	(8)0.12	----

Antibióticos

amoxicilina	6	(19)0.0	(95)0.147	(122)0.245	(16)0.1	----	(20)0.0
azitromicina	5	(19)0.45	(95)0.4	(52)0.14	(10)0.0	----	----
Cloranfenicol	5	(27)0.19	(90)0.56	(387)1.3	(98)0.0	----	(20)0.0
clortetraciclina	5	(5)171	(80)90.9	(420)0.69	(156)0.0	----	----
Ciprofloxacino	7	(7)4.23	(193)5.6	(215)0.36	(10)0.0	(6)0.0	----
Claritromicina	5	(123)1.47	(333)4.5	(293)0.95	(152)0.0	----	----
Doxiciclina	6	(34)10	(101)10.9	(328)0.073	(37)0.0	----	----
Eritromicina	11	(114)1.51	(325)6.0	(599)1.7	(152)0.0	(8)0.005	(20)0.005
Norfloxacina	7	(71)0.96	(86)0.33	(186)0.251	----	(12)0.0	(20)0.028
Ofloxacina	10	(10)0.67	(161)1.081	(110)0.306	----	(12)0.0	(20)0.016
Oxitetraciclina	6	(30)47.0	(91)6.53	(423)0.34	(48)0.0	(6)0.0	----
Roxitromicina	7	(155)1.5	(353)1.7	(617)0.56	(159)0.01	(2)0.0	(20)0.031
Sulfametacina	7	(32)97.23	(121)0.363	(654)0.408	(142)0.24	(9)0.0	(20)0.0
sulfametoxazol	13	(117)9.0	(268)4.7	(851)4.9	(166)0.47	(24)0.08	(44)0.081
Sulfatiazol	5	(5)1158.68	(29)4.27	(178)0.52	(11)0.02	(3)0.0	----
Tetraciclina	5	(32)48	(107)3.6	(422)0.11	(48)0.0	----	----
Trimetoprim	12	(119)7.9	(379)2.4	(877)0.8	(164)0.04	(14)0.0	(44)0.125
Trilosina	5	(124)1.5	(272)0.72	(450)0.28	(59)0.0	(6)0.04	----

Anticoagulantes

Fluoxetina	8	(27)1.236	(53)0.56	(78)0.034	----	----	----
------------	---	-----------	----------	-----------	------	------	------

Antiepilépticos

carbamazepina	14	(234)9.42	(652)22	(1103)2.5	(226)1.1	(37)0.043	(44)0.997
---------------	----	-----------	---------	-----------	----------	-----------	-----------

Antiulcerosos

Ranitidina	5	(16)1.7	(28)0.61	(128)0.142	----	----	(44)0.0
------------	---	---------	----------	------------	------	------	---------

Betabloqueantes

Atenolol	10	(68)122	(223)1.68	(325)0.465	(105)0.0	----	(8)0.245
Metoprolol	10	(81)7.2	(374)9.12	(427)2.2	(128)0.065	----	(8)0.118
Propranolol	8	(83)10	(336)1.111	(400)0.59	(143)0.096	----	(8)0.224
Sotalol	6	(51)3.526	(171)6.5	(252)0.95	(102)0.56	----	----

Bronquiolíticos

Salbutamol	6	(31)3.3	(250)15.8	(417)0.471	(93)0.0	(7)0.0	----
------------	---	---------	-----------	------------	---------	--------	------

Citostáticos

ciclofosfamida	6	(43)0.011	(210)0.003	(284)0.1	(85)0.0	(12)0.0	----
----------------	---	-----------	------------	----------	---------	---------	------

Medios de contraste

Iopromida	5	(28)72	(108)22	(627)4	(103)0.21	(19)0.086	----
-----------	---	--------	---------	--------	-----------	-----------	------

Metabolitos

ac. clorofibrico	14	(190)4.38	(512)3.29	(611)0.63	(181)11	(171)0.17	(15)0.019
ac. salicílico	6	(104)88.99	(168)35	(123)17	(2)0.043	(3)0.04	----

Reguladores de lípidos

Bezafibrato	8	(79)9.43	(380)4.8	(581)3.1	(77)0.19	(67)0.027	(8)0.027
Fenofibrato	5	(41)0.0	(73)0.31	(154)0.025	(35)0.0	(12)0.0	(38)0.0
Gemfibrozilo	9	(91)36.53	(288)4.76	(623)58	(26)0.0	(79)0.002	(8)0.018
simvastatina	5	(9)0.004	(19)0.001	(78)0.001	(6)0.0	(6)0.0	----

Tranquilizantes

Diazepam	7	(43)5	(263)0.66	(401)0.034	(97)0.0	(20)0.0	(8)0.004
----------	---	-------	-----------	------------	---------	---------	----------

Vasodilatadores

Pentoxifilina	5	(2)0.0	(47)0.045	(139)0.299	(13)0.0	(2)0.0	-----
---------------	---	--------	-----------	------------	---------	--------	-------

Tabla 3. Medicamentos en aguas residuales y superficiales españolas (valores máximos, n µg. l⁻¹. Entre paréntesis, el número de muestras considerado) (86).

Fármaco	EDARi	EDARe	AS
Diclofenaco	(56)3.6	(47)2.2	(20)0.06
Ibuprofeno	(58)168	(49)28	(20)0.3
Indometacina	----	-----	(10)0.01
Ketoprofeno	(5)0.96	(5)0.75	(17)0.144
Naproxen	(39)8.62	(39)0.45	(27)0.247
Paracetamol	(56)246	(47)6.2	(13)0.25
Propifenazona	(5)0.85	(5)0.45	(17)0.059
Azitromicina	(5)0.45	(5)0.3	(17)0.068
Eritromicina	(11)0.25	(5)0.28	(21)0.2
Ofloxacina	----	----	(17)0.146
Sulfametoxazol	(5)0.96	(5)0.8	(17)0.169
Trimetoprim	(11)0.65	(5)0.23	(17)0.069
Fluoxetina	----	----	(10)0.0
Carbamazepina	(58)0.95	(49)0.168	(22)0.279
Ranitidina	(6)1.7	----	(17)0.142
Atenolol	(11)122	(5)1.2	(17)0.465
Propranolol	(41)6.5	(35)0.52	(20)0.063
Sotalol	----	----	(10)0.07
Bezafibrato	----	(30)0.0	(30)0.0
Gemfibrosil	----	----	(17)0.497
ac. clorofibrico	(30)2.02	(30)0.12	(20)0.02
ac. salicílico	(30)0.0	(30)0.19	(3)0.013

De la misma recopilación se desagregaron en la Tabla 3 los datos correspondientes a España, que afectan a 22 fármacos. En este caso, los valores se refieren exclusivamente a las aguas procedentes de las EDARs y a

las superficiales. De las subterráneas, de bebida y marinas, no existe información. En su conjunto, estos valores no difieren de forma significativa, de los totales, si bien habría que señalar que existen algunos fármacos que presentan

los valores máximos de todo el conjunto analizado como ocurre con el ibuprofeno, paracetamol, propifenazona, azitromicina, ranitidina, atenolol y propranolol.

De todas formas el estudio de Saderzsky et al., 2010 (86) que contiene datos hasta el año 2009 no consideró el caso de la planta depuradora de Patancheru Enviro Tech Ltd. en la India, que recibe 1500 m³ al día de aguas residuales procedentes de un complejo de 90 industrias farmacéuticas (87). Hasta la actualidad se considera que es el caso, recogido por la bibliografía, en la que la contaminación por productos farmacéuticos alcanza los niveles más elevados (de 100.000 a un millón de veces superior a los valores determinados en USA y China para los mismos productos). Los efluentes de la depuradora contenían 14 mg.l⁻¹ de ciprofloxacino, 2.1 mg.l⁻¹ de cetirizina y, del orden de los microgramos litro, un conjunto importante de otros APIs. Los cursos fluviales aguas abajo de la depuradora tenían valores de 2.500 a 10 μ- l⁻¹ de ciprofloxacino y de 530 a 97 μ.l⁻¹ de ceterizina. Varios lagos próximos estaban igualmente contaminados por estos productos y hasta las aguas subterráneas tenían valores del orden de los nanogramos por litro.

Los sedimentos, fluviales y marinos, pueden también ser puntos de localización de medicamentos, pero la información sobre estos casos es mucho menor. Savci, S, 2013 (88), en una revisión sobre este problema, considera, en primer lugar, que es un medio mal estudiado, pero que de acuerdo con la bibliografía presentan niveles de contaminación por fármacos que deberían ser considerados en las evaluaciones de riesgos. Cita casos, como los del río Danubio, en cuyos sedimentos Varga et al., 2010 (89) encuentran niveles de naproxeno de 2 a 20 ng.g⁻¹ y de 5 a 38 ng.g⁻¹ de diclofenaco, Lei et al., 2009 (90), en China, con niveles de estrógenos de 0.98 a 51.6 ng.g⁻¹, de Yang et al., 2010 (91) que encuentran diferentes antibióticos, con valores máximos de 1.56 μ.g⁻¹ para el antibiótico ofloxacino, o los de Zhou et al., 2011 (92), que en varios ríos del norte de China encuentra antibióticos en cantidades de hasta 5770, 1290, 653 y 652 ng.g⁻¹ de norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino y oxitetraciclina. Por otra parte, destaca los estudios españoles sobre sedimentos en el río Ebro, de Silva et al., 2011(93), donde se localizan productos como el paracetamol (con valores máximos de 222 ng.g⁻¹), la mevastatina (99.4 ng.g⁻¹) y la tilosina A (71 ng.g⁻¹), entre otros. En el mismo sentido habría que citar los estudios de Vázquez-Roig et al., 2011 (94) sobre sedimentos semiterrestres (el marsh de Pego-Oliva, en Valencia) con valores de hasta 15.1 ng.g⁻¹ de productos farmacéuticos, sobre todo de carbamacepina y paracetamol.

Los medicamentos de uso veterinario se vierten de forma prioritaria sobre el suelo dando origen a lo que se conoce como contaminación “difusa” por estar generada por numerosos puntos de emisión difícilmente localizables, tanto en el espacio como en el tiempo. Las dos formas fundamentales de vertido son: o bien directamente, por el ganado en régimen de pastoreo, o bien por esparcimiento de abonado orgánico, que normalmente

experimenta un proceso de maduración en fosas o de enriquecimiento con otros productos como pueden ser los restos vegetales. Los medicamentos aportados por alguna de estas vías sufren un proceso de degradación, que en general es bastante eficaz (95) y solo los muy persistentes son los que se pueden detectar en el suelo. Este es el caso de las tetraciclinas, que fueron encontradas en cantidades muy significativas, como ocurre con la tetraciclina, con valores de 86 a 172 μg.kg⁻¹ (96), 400 μg.kg⁻¹ (97), 450 a 900 μg.kg⁻¹ (98), la oxitetraciclina, con valores de 27 μg.kg⁻¹ (99), o de 1691 μg.kg⁻¹ (100), o la clortetraciclina, con valores de 7.3 μg.kg⁻¹ (101) o de 93 μg.kg⁻¹ (102). Otros antibióticos encontrados en el suelo en cantidades significativas fueron la sulfocloropiridacina, con valores de 365 μg.kg⁻¹(103) y la doxiciclina, con 1331 μg.kg⁻¹ (104).

Otros medicamentos que se usan en grandes cantidades en las actividades ganaderas como son las hormonas, al ser fácilmente degradables en el suelo, solo aparecen, cuando se detectan, en cantidades del orden de los nanogramos por kg.

5. EFECTOS DE LOS MEDICAMENTOS EMITIDOS AL MEDIO AMBIENTE

Hasta el momento no existe ningún estudio convincente que demuestre la existencia de efectos sobre la salud humana de los residuos de medicamentos detectados en alimentos, suelos, sedimentos o aguas. Y, en general, se admite que su presencia en el medio no constituye ningún problema aunque “no es deseable que sustancias biológicamente activas como las medicinas de uso humano entren en el medio ambiente” (105). Webb et al, 2003 (106), en un estudio en Alemania sobre la presencia en el agua de bebida de 60 medicamentos, concluye que, en la mayoría de los casos, la diferencia entre la posible ingesta diaria y la dosis terapéutica es, como mínimo de 150.000. Otros estudios (107, 108) coinciden en que la mayoría de las sustancias se encuentran en concentraciones que ofrecen un amplio margen de seguridad frente a sus posibles efectos adversos, pero que, sin embargo, la “incertidumbre permanece”, en particular, en relación con los efectos de las mezclas de medicamentos, los efectos crónicos a dosis bajas y sus efectos sobre los grupos de población más sensibles. Sumpster, JP., 2010 (109) considera que el único problema de salud pública que debería ser considerado es el de los posibles efectos sobre el feto de las sustancias citotóxicas ingeridas por las madres gestantes.

No ocurre lo mismo, en relación con los efectos de los medicamentos sobre diferentes grupos biológicos. En estos casos existen ya un número bastante amplio de trabajos que demuestran los efectos ecotoxicológicos de los medicamentos (110). Es tradicional, el caso del envenenamiento por diclofenaco de una población de buitres en el Sudeste de Asia. Tres especies de buitres vieron disminuidas sus poblaciones en un 97%, llegando casi a la extinción de alguna de ellas, por la ingestión de este medicamento antiinflamatorio de uso veterinario (111)

utilizado sobre todo en el ganado bovino. El envenenamiento se produjo cuando los buitres se alimentaron de las carcasas del ganado muerto y abandonado que había sido tratado previamente con diclofenaco. Los buitres y en general las especies del género *Gypsus* son extremadamente sensibles a este fármaco (la dosis letal es del orden de 0.1 a 0.2 mg.kg⁻¹) y la concentración de este producto en las carcasas de bovinos se mostró suficiente para justificar una apreciable mortalidad en las poblaciones de buitres. Están citados otros casos de la influencia letal del diclofenaco en las poblaciones del género *Gypsus* en otros países (112).

En la actualidad existe también una alta evidencia de procesos de feminización en peces inducidos por la emisión de medicamentos hormonales al medio. Varios estudios de campo en los ríos británicos mostraron la existencia de peces intersexuados (113) así como en otros países (114), que en la mayoría de los casos presentaban elevadas concentraciones en plasma de vitelogenina, lo que sugería la exposición a productos estrogénicos. En la mayor parte de los casos estos efectos estaban asociados a la presencia de efluentes de las EDARs, donde se encontraban cantidades importantes de esteroides naturales (como el estradiol) o sintéticos (como la EE2). No está claro, si estos últimos juegan un papel predominante en el proceso de feminización de peces, sin embargo estudios de laboratorio demostraron una alta sensibilidad de los organismos acuáticos a este producto, con valores tan bajos de PNEC (concentración prevista sin efecto feminizante) inferiores a 1 ng.l⁻¹ (115). Otros estudios, muestran que concentraciones de 4 ng.l⁻¹ de EE2 causan una severa feminización en peces y reducen su potencial reproductor (116).

Existen otros trabajos de toxicología, crónica y aguda, que muestran efectos adversos sobre el metabolismo y crecimiento de peces (pez cebra, medaka, salmónidos, etc.) de medicamentos como el diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol, propranolol, carbamazepina, clofibrato, etc. (117).

Otros estudios toxicológicos de laboratorio, y algunos de campo, muestran también efectos adversos de diversos medicamentos sobre algas e invertebrados. En el amplio estudio de revisión de Santos, L.H. et al., 2010 (118) se citan casos de antiinflamatorios no esteroides, reductores de lípidos en sangre, antibióticos, antidepresivos y antineoplásicos que tienen efectos adversos sobre el desarrollo y metabolismo de los géneros *Gammarus*, *Daphnia*, *Lemna*, *Hydra*, etc., así como diversas especies de algas.

De todas formas, estos estudios toxicológicos de laboratorio se realizan en muchos casos con concentraciones que exceden, normalmente, las que se dan habitualmente en el medio, por lo que su extrapolación a la realidad no se puede realizar tan fácilmente. Boxwall, A y Grennwood, R, 2010 (119) en un estudio sobre 38 medicamentos, de los más citados en los estudios ambientales, comparan las dosis máximas encontradas en el medio con la dosis más baja que produce efectos

toxicológicos y concluyen que la mayoría se encuentran muy por debajo de este umbral, por lo que su riesgo ambiental, es mínimo. Solo algunos, como el 17-alfa etilenestradiol, paracetamol, ácido salicílico, 17 alfa/beta-estradiol e ibuprofeno, supondrían un riesgo ambiental.

Estas apreciaciones, que minimizarían el riesgo de la presencia de los medicamentos en el medio por sus consecuencias ecotoxicológicas, habría que matizarlas también con el hecho de que en estos estudios no se consideran, normalmente, los riesgos derivados de las mezclas de medicamentos y de que en general, los estudios de toxicidad crónica se realizan en períodos de tiempo demasiado cortos. Santos, LH et al., 2010 (120) en su revisión de 216 trabajos señalan que solo en uno la duración del estudio, con siete años, podría considerarse como de suficiente garantía.

No se puede ignorar, finalmente, que aunque las moléculas de los APIs presentes en el medio ambiente tienen, en general, una vida media inferior a la de los contaminantes tradicionales (DDT, PCBs, etc.) el hecho de que su emisión se produzca de forma más o menos continua, les confiere un comportamiento similar a la de los productos persistentes, efecto conocido como "pseudopersistencia" (121), por lo que sus efectos se deberán considerar, en la mayor parte de los casos, como de toxicidad crónica.

6. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL (GUÍA UE-2006)

El 1 de diciembre del año 2006 la UE después de un largo proceso de gestación de más de seis años aprobó la *Guía para la Evaluación del Riesgo Ambiental de Productos Medicinales para Uso Humano* que fue requerida para todos los procesos de autorización de comercialización en el territorio comunitario de nuevos productos de uso medicinal. Aunque una se exige evaluación positiva, en general, para la circulación de estos productos, no siempre será motivo de rechazo por que en el caso de los medicamentos de uso humano, debe analizarse, caso por caso, sopesando tanto los riesgos como los beneficios potenciales del nuevo producto.

En España esta Guía (UE-2006) fue incorporada como procedimiento de evaluación de riesgos ambientales en el año 2007 en el RD 1345/2007 de autorización de registro y condiciones de comercialización de medicamentos de uso humano (BOE 267-07.11.2007).

En esencia esta Guía utiliza un proceso secuencial de tres etapas: FASE I (Estimación de la Exposición), FASE II. (Ruta ambiental y análisis de efectos), con los tramos A y B, que suponen dos grados crecientes de refinamiento en la evaluación.

FASE I. La exposición al fármaco se determinará a partir de las concentraciones del producto en los distintos compartimientos del medio (aguas superficiales, aguas subterráneas, sedimentos y suelos). Aunque existe, como ya se vio, una abundante literatura a este respecto, en la práctica solo se considerarán las aguas superficiales, por estar disponibles más datos sobre ellas y, porque las rutas

de transporte al ser humano a través del agua de bebida, son más fáciles de definir. De todas formas, dada la gran variedad de métodos analíticos y estadísticos utilizados, estos datos precisarían de una cierta armonización, algo que solo en ciertos países se comenzó a realizar. En la práctica se utilizan procedimientos de predicción de las concentraciones ambientales (CAPs) bien mediante modelos como EUSES v 2.0 (Lijzen, J.P. y Rikken, M.G., 2004) o, en la mayor parte de los casos, por el sencillo procedimiento que recomienda la propia Guía:

$$CAP_{as} (\text{mg.l}^{-1}) = \text{DOSIS}_{ai} \cdot F_{pen} / \text{AR} \cdot D.$$

En la que DOSIS_{ai} es la máxima dosis consumida por habitante y día. F_{pen} , corresponde a la fracción de penetración en el mercado, que normalmente se define, por defecto, como 0.01. AR; sería la cantidad de agua residual generada por habitante y día, que también se puede definir por defecto igual a $200 \text{ l.hab}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$. Y D, sería la dilución estimada para el AR en el curso de agua, que se estima en 10. Si los valores de PEC son iguales o superiores a $0.01 \mu\text{g.l}^{-1}$ se pasaría a la FASE II. Si no, se da por concluida la evaluación. Pueden existir algunos casos (p.e. con los disruptores endocrinos) en los que aunque los valores sean inferiores a ese umbral, se siga igualmente a la FASE II.

En la FASE II. Tramo A, se va a realizar una evaluación más refinada de las CAPs, con nuevos datos y se van a comparar sus valores con la concentración en la que no se observan efectos (CNOE) multiplicada por un factor de incertidumbre de 10, la que se denominaría concentración predicha en la que no se observan efectos (CPNOE). Si la relación CAP: CPNOE es inferior a 1, se considera que no existe riesgo ambiental y se concluye la evaluación. Si es superior a 1 se pasaría a la FASE II. Tramo B. También se pasaría a este tramo, independientemente de la relación anterior, si las propiedades físico-químicas del producto u otras consideraciones hacen previsible la acumulación del fármaco en lodos de depuradora ($K_{co} > 10.000 \text{ l.kg}^{-1}$), en los seres vivos por bioacumulación ($K_{ow} > 1000$) o, en sedimentos ($> 10\%$ en este compartimiento). En este tramo A se realizaría también una evaluación del riesgo en aguas subterráneas, considerando que el CAP_{asub} es equivalente a $0.25 \cdot CAP_{asup}$.

FASE II. Tramo B. Se realizaría una nueva evaluación, todavía más refinada, de las CAPs y se efectuaría la misma comparación con las CPNOE, con los mismos criterios de evaluación (CAP: CPNOE < 1 , no hay riesgo). Simultáneamente, se realizaría por protocolos de evaluación específicos evaluaciones de riesgos para lodos, bioacumulación y sedimentos.

Para los medicamentos de uso veterinario la UE (EMA, 2007) publicó una Guía revisada redactada con los mismos principios pero que presentaba algunas particularidades, como en la FASE I, donde, además de incluir la relación con las CNOE, para especies acuáticas (sin riesgo, CAP: CNOE $< 1 \mu\text{g.l}^{-1}$) incorporaba otra para especies terrestres con el CPA del suelo, siendo ahora la relación sin riesgo (CAP_s: CNOE $< 100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$). En la FASE II. Tramo A, distingue además tres posibilidades: acuicultura, ganadería

intensiva, estabulada y ganadería extensiva, en pastoreo.

Con criterios semejantes, que toman como punto de partida la determinación de los CAPs en el agua u otros compartimientos del medio, se establecieron en diferentes países (Dinamarca, Suecia, Alemania, UK, Suiza, USA, Japón, etc.) protocolos de evaluación de riesgos por la presencia de medicamentos en el medio. En España, el grupo de Damiá Barceló realizó algunos estudios en este sentido (122), así como el de Esteban Alonso, para Sevilla (123) o Doñana (124) o el de Vazquez-Roig, P et al. (125) sobre las marismas de Pego-Oliva (Valencia).

Uno de los objetivos fundamentales que se persiguen con la aplicación de estos protocolos de evaluación de riesgos es la de seleccionar aquellos medicamentos que puedan suponer un mayor peligro para la salud pública o de los ecosistemas, bien por las características de su molécula o por las circunstancias de su consumo y eliminación. El poder establecer estas prioridades, es fundamental para concentrar los recursos en el estudio de aquellos casos que presuponen un mayor riesgo, ya que resultaría totalmente inabordable hacerlo sobre la totalidad de los medicamentos utilizados, así como sobre la multiplicidad de circunstancias que afectan a su uso.

7. PREVENCIÓN Y ATENUACIÓN DE LOS RIESGOS. FARMACOVIGILANCIA

Klaus Kümmerer (126), del Departamento de Environmental Health Sciences de la Universidad de Friburgo, y uno de los más reconocidos investigadores actuales en el estudio de los problemas ambientales de los medicamentos, clasifica las estrategias para reducir la entrada de los fármacos en el medio, en tres niveles:

Corto y medio plazo. Medidas tecnológicas de tratamiento de efluentes de las EDARs.

Medio plazo. Medidas de control ambiental en los procesos de fabricación y medidas preventivas en la prescripción, consumo y eliminación de medicamentos.

Largo plazo. Diseño de nuevos productos en los que se tenga en cuenta sus comportamiento ambiental ("Farmacia verde").

Los efluentes de las EDARs son una de las principales vías de entrada de los medicamentos en las aguas superficiales, por lo que fue uno de los primeros problemas que se abordaron en lo relativo a la prevención y atenuación de sus riesgos. Se constató, que así como los compuestos polares se eliminan con bastante eficacia con los sistemas biológicos convencionales, no ocurría lo mismo con los hidrófobos, que quedaban retenidos en altas proporciones en los lodos de depuradora (127). De todas formas, un estudio de Zabczynski, S et al. (128) muestra que los tratamientos biológicos convencionales pueden mejorar sensiblemente su eficacia regulando el tiempo de retención de lodos y el de retención hidráulica. De los diferentes tratamientos avanzados propuestos se encuentra que la ozonación y el carbón activo incrementan de forma significativa la eliminación en las EDARs de estos compuestos recalcitrantes (129).

En relación con las medidas que pueden adoptar las compañías farmacéuticas, con la aplicación de los Códigos de Buenas Prácticas de Fabricación que se fueron incorporando en los últimos años se apreció una sensible mejora en cuanto a la utilización de materias primas ambientalmente compatibles, así como en una gestión bastante más eficaz de los residuos.

También se dieron pasos importantes en cuanto a la prescripción de medicamentos, al utilizarse productos cada vez más específicos así como la progresiva generalización de las dosis individualizadas. De todas formas, en determinados países como Suecia, se dieron pasos todavía más innovadores al incluir entre las características a considerar en relación con el medicamento, su previsible comportamiento ambiental, publicando bases de datos con sus relaciones CAP:CENOE, así como su degradabilidad y biodisponibilidad (130).

La educación del consumidor en relación con la utilización racional de los fármacos es una cuestión fundamental, pues la eliminación de los productos no utilizados o caducados debería de realizarse siempre mediante los mecanismos establecidos en los diferentes países para la eliminación de los residuos farmacéuticos (131). Cuestión que todavía deja mucho por desear.

Finalmente, en el diseño de nuevos fármacos, Kummerer, K. (132) así como antes lo hiciera Daugton, G.C. (133), proponen la aplicación de los principios de la “química verde” en el sentido de incluir entre los objetivos a desarrollar, el de un comportamiento más ambientalmente compatible de los nuevos productos. Kummerer muestra diversos ejemplos en los que la búsqueda de determinadas dianas farmacológicas fue compatible con un mejor comportamiento ambiental del nuevo producto, proponiendo como la mejor opción de futuro una farmacia “verde y sostenible” (134).

La farmacovigilancia según la OMS se ocupa de la “detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos adversos de los medicamentos o cualquier otro problema relacionado con ellos” (135). Tradicionalmente se orientó hacia los efectos adversos derivados del uso de medicamentos humanos o veterinarios, pero en la actualidad, se pretende también que este concepto se amplíe hacia los efectos adversos sobre el medio ambiente definiendo una nueva denominación, como “ecofarmacología” (136) o “farmaEcovigilancia” (137). En cualquier caso, esta concepción holística y ampliada de la farmacovigilancia estaría orientada, también, a estudiar y controlar los aspectos relacionados con la distribución y consumo de medicamentos identificando aquellas áreas donde determinados cambios podrían reducir la emisión de APIs al medio ambiente (138).

Realizaría actividades orientadas hacia el conocimiento del consumo y ciclo de vida de los medicamentos, así como de su aparición en los diferentes compartimientos del medio. Dado el elevado número de fármacos en el mercado, se centraría la farmacovigilancia en un número muy reducido de ellos, priorizados en relación con su alto riesgo ambiental. Estos fármacos-testigo podrían

variar con la época o la zona, por lo que habría que diseñar un proceso de monitorización flexible y adaptable a las circunstancias tanto del consumo como de la emisión al medio de los medicamentos.

La legislación europea, recoge ya estas implicaciones ambientales en su Guía sobre farmacovigilancia de medicamentos veterinarios (139), así como, implícitamente, en su Regulación sobre Registro, Evaluación, Autorización y Restricciones sobre Productos Químicos (140) en la que se obliga a “minimizar el impacto ambiental de nuevos productos sobre el ser humano y el medio ambiente a lo largo de su ciclo de vida”. Finalmente, en un documento remitido para consulta a los estados miembros sobre los fármacos contaminantes ambientalmente persistentes (EPPPs) recomienda que en el año 2015 se desarrolle una estrategia en relación con la contaminación del agua por productos farmacéuticos y que en el 2017 se adopten las medidas de mitigación oportunas, recomendando “la monitorización de los medicamentos humanos y veterinarios en el medio ambiente”.

En España, aunque todavía no se adoptaron resoluciones concretas en relación con esta temática (salvo alguna medida para la recogida y tratamiento de residuos farmacéuticos, como el Plan SIGRE) el Real Decreto 1345/2007 que regula las solicitudes de autorización de comercialización de medicamentos, implícitamente, ampara este tipo de medidas de control y monitorización ambiental en su artículo 6.h al exigir a los nuevos productos: “Indicaciones sobre las medidas de precaución y seguridad que han de adoptarse al almacenar el medicamento, al administrarlo al paciente y al eliminar los productos residuales, junto con la indicación de cualquier riesgo potencial que el medicamento pudiera presentar para el medio ambiente”.

8. CONCLUSIÓN

Un buen y actualizado resumen de la problemática que se acaba de analizar puede encontrar en la documentación presentada el pasado diciembre (14-17,12.2014) por la SAICM (Strategic Approach to International Chemical Management), organización de la OMS y UNEP, en el Workshop celebrado en Ginebra, “Unwelt Bundesant”, 2014 (141). En ella se señalaba que los medicamentos se encuentran en el medio ambiente en todo tipo de países (en desarrollo, emergentes e industrializados) y que los casos estudiados demuestran que se pueden producir daños sobre los ecosistemas, mientras que en lo relativo a la salud humana, de acuerdo con los conocimientos actuales, no se esperan efectos adversos. Consideran, de todas formas, que la escasez de suficientes programas de monitorización supone un gran reto para el futuro para poder dilucidar en qué medida las bajas concentraciones de los medicamentos encontrados en el medio pueden suponer un riesgo sanitario. Proponen, finalmente, acciones globales adecuadas “para reducir la entrada de los productos farmacéuticos en el medio ambiente sin comprometer la efectividad, disponibilidad o

viabilidad del tratamiento médico, especialmente en los países en los que el acceso a los cuidados sanitarios es todavía limitado”.

9. AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Ángel Concheiro Nine, catedrático de la Facultade de Farmacia de la USC, por las sugerencias y recomendaciones aportadas al original de este trabajo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Coats JR, Metcalf RL, Lu P-Y, Brown DD., Williams JF, Hansen LG.. Model Ecosystem Evaluation of the Environmental Impacts of the Veterinary Drugs Phenothiazine, Sulfametazina, Clopidor and Diethylstilbestrol. *Envir. Health Perspect* 1976; 18: 167-79.
2. Chiu S-H., Green ML. Baylis FP. Eline D. Rosegay A, Meriwether H. and Jacob TA. Absortion, Tissue Distribution and Excrepcion of Tritium-Lavelled Ivermectin in Cattle, Sheep and Rat. *J. Agric.Food. Chem.* 1990; 38: 2072-2078.
3. Holter PC,Sommer,J., Gronvold J and Madsen M . Effects of ivermectin treatment on the atention of dung beetles to cow pats. *Bull. Entomol. Research* 1993; 83: 53-58.
4. Jacobsen P. and Berglind L. Persistence of Oxytetracycline in Sediments from Fish Farms. *Aquaculture*, 1988 ; 70: 365-370
5. Björklund H, Bondestam J and Bylund G. Residues of oxolinic acid andoxytetracycline in fish and sediments from fish farms. Thesis. Departament of Biology. Abo Akademi University. Finland.1991
6. Ervik A. Thorsen B, Eriksen V, Lunestad BT and Samuelsen OB. Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farms. *Dis. Aqual. Org.* 1994; 18: 45-51.
7. Schneider J. Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture – a review. *Química Analítica.* 1994; 13 (supp.1): S34 – S42.
- 8 . Watts CD, Craythorne M ,Fielding and Steel CP. Identification of Non-volatile Organics in Water Using Field Desorption Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography. 3e d. European Symposium on organic Micopollutents in Water (ed.) Angeletti, A and Bjorseth DD. (pags. 120-131). Reidel Pub C. Dordrech.1993.
9. Aerne GW, English J and Marks V. The role of immunopassay in the analysis of microcontaminants in river samples. *Ecotoxology and Environm Safey.* 1985; 9: 79-83.
10. Richardson ML and Bowron JM. The fate of Pharmaceuticals chemicals in the aquatic environment- A review. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985; 37: 1-12.
11. Stumpf M, Ternes, TA., Haberer,K, Seel, P and Baumann W. Nachweis von Arzneimittelrückständen in Klärungen und Flicssgewässern. *Von Wasser*, 1996; 86: 291-303.
12. Gartiser SL, Brinker, A, Uhl, R, Willmund M,

Krümmerer K. and Daschner F. Investigation of hospital effluents – the example of the Friburg university hospital. *Industrialwässer.* 1994; 9: 1618-1624.

13. Giuliana F, Koller T, Würgler FE. and Widmer RM. Detection of genotoxic activity in native hospital water by the umuC test. *Mutation Res.* 1996; 368: 49-57.

14. Christensen FM. Pharmaceuticals in the Environment - A Human Risk? *Regulat. Toxicol. Pharmacology*, 1998; 28, 3:212-221.

15. Kümmerer K. (Ed.) *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks.* 3rd ed. Springer-Verlag. Berlin., 2008.

16. Environmental Agency. *Res. Develop. Tech. Rep. P390. Review of Human Pharmaceuticals in the Environment.* WRc , Swindon, Wilts, UK. 2000.

17. Daughton CG. y Jones-Lepp, TL (Eds.) *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues.* ACS/Oxford Univ. Press. Washington DC 2001.

18. Dietrich DR , Webb SF. y Petry T. (Eds.) *Spots Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment* Elsevier Academic Press. New York, 2005.

19. AWWA Ocurrance Survey of Pharmaceutically Active Compounds. *AWWA Res. Found. USA.* 2005

20. Williams R T. (Ed.) *Assessing Impacts on Aquatic Ecosystems.* SETAC (Soc. Env. Tox. And Chem.). Pensacola, FL., 2005.

21. Ternes TA. y Joss A. (Eds.) *Human Pharmaceuticals, hormones and Fragances. The challenge of micropollutants in urban water management.* IWA Pub. Londres 2006

22. Petrovic M, Pérez S. y Barceló D. (Eds.) *Analysis, Removal, Effects and Risks of Pharmaceuticals in the Water Cycle.* 2007, 2nd ed. 2013

23. Aga D. *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and the Water Treatments Plants.* CRC Press. Boca Raton. Fl. 2008

24. Rahman SZ , Shahid M. y Gupta V. (Eds.) *An Introduction to Environmental Pharmacology.* Ibn Sina Academia, India 2008

25. Crane M, Boxall AB y Berrett K. (Eds.) *Veterinary Medicines in the Environment* SETAC Press. Pensacola (FI). 2009

26. Kümmerer K y Hempel M. (Eds.) *Green and Sustainable Pharmacy.* Springer-Verlag. Berlin 2010.

27. Roig B. (Ed.) *Pharmaceuticals in the Environment. Current knowledge and need assessment to reduce presence and impact.* IWA Pub. Londres 2010.

28. Brooks TA, Huggett DB. (Eds.) *Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future perspectives.* Springer. New York 2012.

29. BIO Intelligence Service. *Study on the Environmental risks of medicinal products.* Executive Agency for Health and Consumers. Paris 2013.

30. Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson, RT, Meteyer, CU, Ridetout, BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudrhry MJ, Arshad M, Madmood S, y Khan AA . Diclofenac in

residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 2004; 427: 630-633.

31. Sumpter JP. Pharmaceuticals in the Environment: Moving from a Problem to a Solution. En: Kümmerer, K. and Hempel, M. Eds. *Green and Sustainable Pharmacy*. Springer-Verlag. Berlin 2010.

32. Solé M, López de Alda, MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barceló D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from Catalanian area (NE Spain). *Environm. Sci. Technol.* 2000; 34: 5076-5083.

33. Petrovic M., Solé M., López de Alda MJ., Barceló D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving waters and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environm. Toxicol. Chem.*, 2002; 21: 2146-2156.

34. Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L., Tirapu Ll. Vilanova M. Barceló D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry. Methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A*, 2001; 938: 187-197.

35. Carballa M, Oimil F, Lema JM, Llompарт M., Jarcia-Jares C, Rodriguez I, Gomez, M. y Ternes T. Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 2004; 38: 2918-2926.

36. Carballa M, Oimil F y Lema JM. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatments. *Water Res.* 2005; 39: 4790-4796.

37. Suárez S, Carballa M, Oimil F y Lema JM. How are pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) removal from urban wastewater? *Rev. Environm. Sci. Biotechnol.* 2008; 7: 125-138.

38. Santos JL, Aparicio I. y Alonso E. Occurrence and risk assessment of pharmaceutally active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Sevilla city (Spain). *Environm. International.* 2007; 33: 596-601.

39. Camacho-Muñoz D, Martín J, Santos JL, Aparicio I y Alonso E. Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain). *Jour. Hazardous Materials*, 2010; 183: 602-608.

40. Benitez FJ, Real FJ, Acero JL, y Roldan G. Removal of selected pharmaceuticals in waters by photochemical processes. *Jour. Chem. Tech. Biotechnol.* 2009; 84,8: 1186-1195.

41. Ibañez M, Guerrero C, Sancho JV. y Hernández F. Screening of antibiotics in surface and wastewaters samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Jour. Chromatogr.* 2009; 1216, 12: 2529-2539.

42. Gil García, MD, Cañada F, Calzoni, MJ, Vera-Candioti L, Siano GG., Goicochea HC. y Martínez-Galera M. Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid

chromatography diode array detection. *Jour. Chromatogr.* 2009; 1216, 29: 5489-5496.

43. Rosal R, Rodríguez A, Perdigon-Melón JA, Petre A. García-Calvo E, Gómez MJ, Agüera A y Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water. Res.* 2010; 44, 2: 578-588.

44. Matamoros V, García J. y Bayona JM. Behaviour of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: a pilot-scale study. *Env. Sci. Technol.* 2005; 39,14: 5449-5454.

45. Mendez-Arriaga F, Gimenez J y Esplugas S. Photocatalytic degradation of non-steroidal antiinflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. *Water Res.* 2008; 42,3: 585-594.

46. Ventura F, Huerta-Fontenla M. y Galcerán MT. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.* 2011; 45,3: 1432-1442.

47. Nieto A, Borull F, Pocurull E. y Marcé RM. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Env. Toxicol. Chem.* 2010; 29,7: 1448-1489.

48. EMA. Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO containing and immunological products (EMEA/CVMP/055/96) 1997.

49. VICH. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. Environmental Impact Assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs). Phase II. VICH GL 38. U.S. Dept. Health and Human Services 2006.

50. VICH. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. Guidance for Industry. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs: General Approach to Testing. VICH GL 33. U.S. Health and Human Services 2009.

51. European Medicines Agency (EMA). Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Pharmaceuticals in support of the VICH Guidelines GL6 and GL38 (VICH-TGD), (EMEA/CVPM/ERA/418282/2005-Rev.1. Londres, 1 Nov., 2007.

52. EMA Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products (CHMP/SWP/00) 2006.

53. U.S. Dept. Health and Human Services. Guidance for Industry. 1998.

54. Kümmerer K. (Eds.) *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks.* Springer-Verlag. Berlin 2nd ed. 2004, 3rd ed. 2008.

55. KNAPPE project. Knowledge and Need Assessment on Pharmaceuticals Products in Environmental Waters. Final report. 2008.

56. BIO Intelligence Service. Study on the Environmental risks of medicinal products. Executive Agency for Health and Consumers. Paris 2013.

57. Grenier, J-F. Maturity of Global Pharma Market confirmed. PharmaExpand Exchange. Disponible en: (pharmaexpand.com/wordpress/?p=223) 2013.
58. KNAPPE project. Knowledge and Need Assessment on Pharmaceuticals Products in Environmental Waters. Final report. 2008.
59. Boxall, AB. *et al.* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environm, Health Perspectives*, 2012; 120, 9: 1221-1229.
60. Alder A, Bruchet A, Carballa M., Clara M, Joss A, Löffler D, McArdell C., Miksch K, Oimil F, Tuhkanen T y Ternes N. Consumption and Occurrence. Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragances. In: Ternes T. y Joss A., Eds. The challenge of micropollutants in urban water management IWA Pub. Londres 2006.
61. BIO Intelligence Service. Study on the Environmental risks of medicinal products. Executive Agency for Health and Consumers. Paris 2013.
62. Simó Miñana J. Utilización de medicamentos en España y Europa. *Atención Primaria*, 2012; 44, 6: 335-347.
63. Le Pen C, Lemasson H. y Roulliere-Lelilec C. La consommation medicamenteuse dans 5 pays europeén: une réévaluation. *LEE (Les entreprises du médicament)*. Paris 2007.
64. Kümmerer K. Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks. Springer-Verlag. Berlin. 2nd. ed. 2004, 3rd ed. 2008.
65. BIO Intelligence Service. Study on the Environmental risks of medicinal products. Executive Agency for Health and Consumers. Paris 2013.
66. Sacher F, Ehmman M, Gabriel S. Graf C. y Brauch HJ. Pharmaceutical residues in the river Rhine-results of a one-decade monitoring programme. *J. Environm. Monit.* 2008; 10: 664-670.
67. Bernard M, Arnols M, Edder P y Orтели D. Micropollutants in the wáter of the river Rhône-2006 Campaign. *Rapp. Comm. Int. prot. Eaux Léman contre pollut. Campagne 2006*: 163-172. 2007.
68. Larsson JD, de Pedro C y Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high level of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 2007; 148: 751-755.
69. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M. y Larsson JD. Contamination of surface, ground and drinking water from pharmaceutical production. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009; 28: 2522-2527.
70. Daughton CG y Ruhoy IS. Environmental Footprint of Pharmaceuticals- The Significance of Factors Beyond Direct Excretion to Sewers. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009; 28, 12: 2495-2521.
71. BIO Intelligence Service. Study on the Environmental risks of medicinal products. Executive Agency for Health and Consumers. Paris 2013.
72. Alder A, Bruchet A, Carballa M, Clara M, Joss A., Löffler D, McArdell C, Miksch K, Oimil F, Tuhkanen T y Ternes N. Consumption and Occurrence. Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragances. In: Ternes T. y Joss A., Eds. The challenge of micropollutants in urban water management IWA Pub. Londres 2006.
73. Lienert J, Bürki T, y Escher BL. Reducing micropollutants with source control: substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. *Water Sci. Technol.* 2007; 56: 87-96.
74. Celiz M D, Tso J. y Aga DS. Pharmaceutical metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risks. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009; 28, 12: 2473-2484.
75. Walgren, JL Mitchell MD y Thompson DC. Role of metabolism in drug induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Cri. Rev. Toxicol.* 2005; 35: 325-361.
76. Nalec-Jawecki, G. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. *Chemosphere*, 2007; 70: 29-35.
77. European Environmental Agency. (EEA). Pharmaceuticals in the Environment. Results of an EEA workshop. Copenhagen. 2010.
78. Roig B. Ed. Pharmaceuticals in the Environment. Current knowledge and need assessment to reduce presence and impact. IWA Pub. Londres 2010.
79. Boxall AB. Fate of veterinary Medicines Applied to Soils. En: Kümmerer K. Ed. Pharmaceuticals in the Environment. Sources, fate, Effects and Risks. Springer-Verlag. Berlin, 2008.
80. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for environment. *Environ. Microbiol.* 2006; 8: 1137-1144.
81. Scottish Environment Protection Agency (SEPA). The occurrence of chemical residues in sediments in Loch Erisort, Loch Roag and Loch a Chain Baihn. Sea Loch Survey, 2012.
82. Sadezky A, Löffler D, Schlüsener M., Roig B. y Ternes T. Real situation: Occurrence on the main investigated PPs in water bodies. En: Roig B, Ed. Pharmaceuticals in the Environment. IWA Pub. Londres, 2010.
83. Airis AZ , Shamsuddin AS y Praveena SM. Occurrence of 17 α -ethynylstradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Env. Int.* 2014; 69: 104-119.
84. Zabczynski S, Buntner D, Miksc K. y Roig B. Performance of conventional treatment processes of the most resistant PPs. En: Roig B, Ed. Pharmaceuticals in the Environment . AGA Pub. Londres, 2010.
85. Sadezky A, Löffler D, Schlüsener M, Roig B. y Ternes T. Real situation: Occurrence on the main investigated PPs in water bodies. En: Roig B. Ed. Pharmaceuticals in the Environment. IWA Pub. Londres, 2010.
86. Sadezky, A., Löffler, D., Schlüsener, M., Roig, B. y Ternes, T. Real situation: Occurrence on the main

- investigated PPs in water bodies. En: Roig B. Ed. *Pharmaceuticals in the Environment*. IWA Pub. Londres, 2010.
87. Fick J, Söderström H., Lindberg RH, Phan C, Tysklind M. y Larsson JD. Contamination of surface, ground and drinking water from pharmaceutical production. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009; 28: 2522-2527.
88. Savci S. A review of occurrence of pharmaceuticals in sediments. *African Jour. Biotechnol.* 2013; 12, 29: 4539-4541.
89. Varga M, Dobor J, Helenkár A, Jurecska L, Yao J. y Zárny G. Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Jour.* 2010; 95: 353-358.
90. Lei B, Huang S, Zhou Y, Wang D y Wang Z. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area. China. *Chemosphere*, 2009; 76, 1: 36-42.
91. Yang. JF, Ying G-G, Zhao J-L, Tao R. Su, H-C. y Chen F. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl River using RRLC-MS/MS. *Sci. Total Environm.* 2010; 408: 424-3432.
92. Zhou L-J, Ying G-G, Zhao J-L. Yang J-F, Yang B. y Liu S. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. *Environm. Pollut.* 2011; 159: 1877-1885.
93. da Silva BF, Jleic A, López-Lerma R. Muzeto AA, Petrovic M. y Barceló D. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 2011; 85, 8: 1331-1339.
94. Vazquez-Roig P. Andreu V, Blasco C. y Picó Y. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Sci. Total Environm.* 2012; 440: 24-32.
95. Monteiro SC, Alistair BA y Boxall BA. Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009; 28, 12: 2546-2554.
96. Hamscher G, Sczesny S, Höper H, y Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2002; 74: 1509-1518.
97. Pawelzick HT, Höper H, Nau H y Hamscher G. A survey the occurrence of various tetracyclines and sulphamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure. SETAC Euro 14th Ann. Meeting: Praga, 2004.
98. Winckler C y Grafe A. Use of Veterinary Drugs in Intensive Animal Production. Evidence for Persistence of Tetracycline in Pig Slurry. *Jour. Soils Sedim.* 2001; 1,2: 66-70.
99. Pawelzick HT, Höper H, Nau H y Hamscher G. A Survey the occurrence of various tetracyclines and sulphamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure. SETAC Euro 14th Ann. Meeting: Praga, 2004.
100. Kay P, Blackwell PA y Boxall AB. Fate the veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environm. Toxicol. Chem.* 2004; 23, 5: 1136-1144.
101. Hamscher G, Sczesny S, Höper H, y Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2002; 74: 1509-1518.
102. Pawelzick HT, Höper H, Nau H y Hamscher G. A survey the occurrence of various tetracyclines and sulphamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure. SETAC Euro 14th Ann. Meeting: Praga, 2004.
103. Kay P, Blackwell PA y Boxall AB. Fate the veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environm. Toxicol. Chem.* 2004; 23, 5: 1136-1144.
104. Ho YB, Zakaria MP, Latif, PA, y Saari N. Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agriculture soil in Malaysia. *Sci. Total Environm.* 2014; 488-489: 261-267.
105. Sumpter, J.P. *Pharmaceuticals in the Environment: Moving from a Problem to a Solution*. En: Kümmerer K. and Hempel M. Eds. *Green and Sustainable Pharmacy*. Springer-Verlag. Berlin 2010.
106. Webb SF, Ternes T, Gibert M. y Olejniczak K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicol. Lett.* 2003; 142: 157-167.
107. WHO. *Pharmaceuticals in drinking water*. Geneva 2011, Disponible en: (www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals_2011601.pdf).
108. Boxall AB, Monteiro SC, Fussell R, Williams RJ, Bruemer J, Greenwood R. y Bersuder P. Targeted monitoring for human pharmaceuticals in vulnerable source and final waters. *Drinking water Inspectorate Project No WDo805 (Ref DWI 70/2/231)*. 2011.
109. Sumpter JP. *Pharmaceuticals in the Environment: Moving from a Problem to a Solution*. En: Kümmerer K and Hempel M. Eds. *Green and Sustainable Pharmacy*. Springer-Verlag. Berlin 2010.
110. Santos, LH, Araújo, AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Martos C. y Montenegro, MC. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Jour. Hazard. Material.* 2010; 175: 45-95.
111. Oaks, JL, Gilbert M, Virani, MZ, Watson, RT, Meteyer, CU, Ridetout, BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Madmood S y Khan AA. Diclofenac in residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 2004; 427: 630-633.
112. Sumpter, J.P. *Pharmaceuticals in the Environment: Moving from a Problem to a Solution*. En: Kümmerer K. and Hempel M. Eds. *Green and Sustainable Pharmacy*. Springer-Verlag. Berlin 2010
113. Jobling S, Williams R, Jhonson A, Taylor A, Gross-

- Sorokin M., Nolan M, Tyler CR, van Aerle R., Santos, EM y Brighty G. Predicted exposures to steroid oestrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild roach populations. *Environm. Health Perspect*, 2006; 114 (suppl. 1): 32-39.
114. Tyler CR y Jobling S. Roach, sex, and gender-bending chemicals: the feminization of wild fish in English rivers. *Bioscience*. 2008; 58: 1051-1059.
115. Caldwell DJ *et al.* Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone 17 α -ethilynstradiol. *Env. Sci. Technol.* 2008; 42,19:7046-7054.
116. Nash JP, Kime DE, van der Ven LT, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P. y Tyler CR. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylloestradiol cause reproductive failure in fish. *Environm. Health Perspect.* 2004; 112: 1725-1733.
117. Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A., Delerue-Martos C. y Montenegro MC Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Jour. Harzard.Material.* 2010; 175: 45-95.
118. Santos, LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A., Delerue-Martos C. y Montenegro MC Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Jour. Harzard.Material.* 2010; 175: 45-95.
119. Boxall A. y Greenwood R. Biological monitoring and endpoints. En: Roig B. Ed. *Pharmaceuticals in the Environment*. AWA Pub. Londres, 2010.
120. Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Martos C. y Montenegro MC. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Jour. Harzard.Material.* 2010; 175: 45-95.
121. Ankley GT, Brooks BW, Huggett DB y Sumpter JP. Repeating History: Pharmaceuticals in the Environment. *Environm. Sci. Technol.* Dec. 15, 2007: 8211-8217.
122. Garcia Galan J, Díaz-Cruz MS y Barceló, D. Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. *Trends Anal. Chem.* 2009 ;28, 6: 804-819.
123. Santos JL, Aparicio I y Alonso E. Occurrence and risk assessment of pharmacutally active compounds in wasterwater treatment plants. A case study: Sevilla city (Spain). *Environm. International*, 2007; 33: 596-601.
124. Camacho-Muñoz D, Martin J, Santos JL, Aparicio I y Alonso E. Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain). *Jour. Hazardous Materials* 2010; 183: 602-608.
125. Vazquez-Roig P. Andreu V., Blasco C y Picó, Y. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Sci. Total Environm.* 2012; 440: 24-32.
126. Kümmerer K. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by life cycle for green engineering as an important approach for green pharmacy and green chemistry. *Green Chem.* 2007; 9: 899-907.
127. Carballa M, Oimil F, Lema JM, Llompарт M., Jarcia-Jares C, Rodriguez I, Gomez M y Ternes T. Behaviour of pharmaceuticals , cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 2004; 38: 2918-2926.
128. Zabczynski S, Buntner D, Miksch K y Roig B. Performance of conventional treatment processes of the most resistant PPs. En: Roig B, Ed. *Pharmaceuticals in the Environment* . AGA Pub. Londres, 2010.
129. BIO Intelligence Service. Study on the Environmental risks of medicinal products. . Executive Agency for Health and Consumers. Paris 2013.
130. FASS (Sewdish Medicines Compendium). Environmental classification of pharmaceuticals. Disponible en: (www.fass.se Guidance for pharmaceuticals companies. 2007).
131. Cabrejas JM y González D. Los residuos farmacéuticos. En: *Los residuos y sus riesgos para la salud*. Madrid: Real Academia de Farmacia 2009; pp. 229-240.
132. Kümmerer K. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by life cycle for green engineering as an important approach for green pharmacy and green chemistry. *Green Chem.* 2007; 9: 899-907.
133. Daughton CG. “Cradle-to-cradle” Stewardship of Drugs for Minimizing Their Environmental Disposition while Promoting Human Health. I. Rationales for and Avenues toward a Green Pharmacy. *Environm. Health Perspect.* 2003; 111: 757-774.
134. Kümmerer K y Hempel M. (eds.) *Green and Sustainable Pharmacy*. Springer-Verlag. Berlin 2010.
135. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos*. Ginebra, 2004.
136. Kummerer K. y Velo G. Ecopharmacology: A New Topic of Importance in Pharmacovigilance. *Drug Safety*, 2006; 29, 5: 371-373.
137. Daughton CG y Ruhoy IS. Environmental Footprint of Pharmaceuticals- The Significance of Factors Beyond Direct Excretion to Sewers. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009; 28, 12: 2495-2521.
138. Daughton CG y Ruhoy IS. Environmental Footprint of Pharmaceuticals- The Significance of Factors Beyond Direct Excretion to Sewers. *Environm. Toxicol. Chem.* 2009;28, 12: 2495-2521.
139. European Medicines Agency (EMA). VICH GL 38 (Ecotoxicity Phase II), Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Pharmaceuticals-Phase II (CVMP/VICH/790/03-Final. Londres, 2004.
140. Union Europea. Regulation (CE) No. 1907/2006 of the European Parliament and the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Luxemburgo. 2006.
141. Umwelt Bundesamt, (version española) *Fármacos en el medio ambiente – la perspectiva global*. Incidencia, efectos y acción cooperativa potencial bajo el SAICM.

IWW (Instituto para el agua de Renania-Westfalia).
Muelheim an der Ruhr. Alemania . Diciembre 2014.



Regulatory framework for human medicinal products

Title in Spanish: *Marco regulatorio de los medicamentos hemoderivados de uso humano*

María Victoria Collazo*, Concepción Alonso Verduras, Gloria Frutos Cabanillas

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), c/ Campezo, 1. Parque Empresarial Las Mercedes. 28022 Madrid

ABSTRACT: A complete review of the regulations applicable to blood derived medicines is made, including European legislation and its transposition into national legislation. This complex and comprehensive regulation is updated and commented to facilitate appropriate guidance to healthcare professionals for its consultation and use. Blood derived products, as chronic medication and susceptible of transmitting diseases, are very important in the pharmaceutical industry, they have a large social and mediatic impact and their manufacturing is based on the use of human plasma as raw material. The discussion on donating plasma altruistically or in remunerated manner and its effect on self-sufficiency for the availability of blood products is also addressed.

RESUMEN: Se hace una revisión integral de la regulación aplicable a los medicamentos hemoderivados, incluyendo la normativa europea así como su transposición a la normativa nacional. Esta regulación compleja y extensa se actualiza y comenta de forma que facilite a los profesionales sanitarios su consulta y aplicación. Los hemoderivados, medicamentos de administración crónica y susceptibles de transmitir enfermedades, tienen gran impacto social y mediático, y su elaboración, de suma importancia en la industria farmacéutica, se basa en la utilización de plasma humano. Se aborda también el debate de la donación de plasma de forma altruista o remunerada y sus consecuencias en la autosuficiencia de un país para la disponibilidad de hemoderivados.

*Corresponding Author: mvcollazo@aemps.es

Received: February 13, 2015 Accepted: April 5, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 103-115

Language of Manuscript: Spanish

1. DIRECTIVAS EUROPEAS

Las disposiciones legales, reglamentarias, administrativas, así como las recomendaciones sobre medicamentos, se establecen por dos instituciones, la Unión Europea (UE) y el Consejo de Europa (CoE).

Dentro del Título XIV del Tratado de Funcionamiento de la UE (TFUE), dedicado a la Salud Pública, el artículo 168 explica la acción de la UE para, complementando las legislaciones nacionales, “mejorar la salud pública, prevenir las enfermedades humanas y evitar las fuentes de peligro para la salud física y psíquica”. En concreto promueve fomentar la cooperación entre los Estados Miembros (EM), permitiendo la libre circulación de medicamentos. En la Figura 1 se representa la relación entre las dos instituciones, UE y CoE, implicadas en la regulación de medicamentos.

De acuerdo con el TFUE, los EM renuncian a una parte de su soberanía de forma que las instituciones europeas adopten una legislación, denominada Derecho derivado, que prevalezca sobre la legislación nacional.

Dentro del Derecho derivado se encuentran los actos jurídicos obligatorios (Reglamentos, Directivas y Decisiones) y no obligatorios (Recomendaciones y Dictámenes), además de disposiciones de otros tipos. Los

Reglamentos son aprobados o bien conjuntamente por el Consejo de la Unión Europea (Consejo Europeo) y el Parlamento Europeo o bien de manera independiente por la Comisión Europea. Aplican a todos los EM y entran en vigor de inmediato, con el rango de ley nacional. Las Directivas establecen los objetivos que deben cumplir los EM, sin prescribir cómo conseguirlos. Pueden ir dirigidas a uno, varios o todos los EM, que deben hacer una transposición a la legislación nacional, antes de la fecha límite que marca la Directiva. En la legislación de medicamentos hay dos tipos de directivas:

-legislativas, que emanan del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo (procedimiento legislativo ordinario) o de alguna de estas dos instituciones (procedimientos legislativos especiales), que la adoptan ejerciendo el poder legislativo comunitario, a propuesta de la Comisión Europea;

-delegadas, con el objetivo de que la Comisión complete o modifique, en elementos no esenciales, los actos legislativos. Una directiva delegada deberá indicar esta naturaleza en su propio título, y no constituye un acto legislativo.

En España, las directivas se transponen en los Reales Decretos correspondientes, que se publican en el Boletín

Oficial del Estado (BOE).




CONSEJO DE EUROPA (Council of Europe)	UNIÓN EUROPEA (European Union)
 <p>El Consejo de Europa fue la primera institución política de Europa.</p>	<p>Consejo Europeo (European Council): Lo forman los Jefes de Estado o Gobierno de los EM, junto con el Presidente de la Comisión Europea, para planificar la política de la UE.</p>
 <p>Asamblea Parlamentaria Constituida por 318 representantes de los 47 países.</p>	<p>Parlamento Europeo Constituido por 766 miembros del Parlamento de los 28 países.</p>
 <p>Comisión Europea de Derechos Humanos</p>	<p>Comisión Europea Órgano ejecutivo de la UE.</p>
<p>Tribunal Europeo de Derechos Humanos</p>	<p>Tribunal Internacional de Justicia Tribunal de Justicia de la UE</p>

Figura 1. Relaciones entre UE y CoE.

Son varias las directivas europeas que legislan los medicamentos de uso humano y, específicamente, los derivados de la sangre y plasma humanos. A continuación se describe la normativa general y específica aplicable a estos medicamentos:

La Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (1), *por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano*, reagrupa en un único texto la legislación comunitaria relativa a los medicamentos de uso humano. Esta Directiva consta de 130 artículos agrupados en 14 Títulos y 3 Anexos. La Tabla 1 presenta un esquema del contenido de dicha directiva, de la cual se describen seguidamente los contenidos más relevantes y, en especial, los que afectan a hemoderivados. Esta Directiva ha ido modificándose parcialmente con nuevas disposiciones desarrolladas en nuevas Directivas, siguiendo una evolución esquematizada en el diagrama de flujo de la Figura 2.

En el Título I, el artículo 1 define los distintos conceptos que se utilizan en la Directiva. Se denomina medicamento a “toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades humanas”. También define los distintos tipos de medicamentos: inmunológico, homeopático, radiofármaco, y medicamentos derivados de sangre o plasma humanos; éstos últimos definidos como “medicamentos a base de constituyentes sanguíneos preparados industrialmente por

establecimientos públicos o privados”. Dichos medicamentos, denominados hemoderivados, comprenden en particular, albúmina, factores de coagulación e inmunoglobulinas de origen humano.

En el Título II, el artículo 3 puntualiza que no aplica a la sangre completa, al plasma ni a las células sanguíneas de origen humano.

El Título III desglosa en cuatro capítulos cómo se comercializan los medicamentos. El Capítulo 1 explica cómo solicitar una autorización de comercialización de un medicamento, siempre y cuando el solicitante esté establecido en la CE y no se trate de una autorización por el procedimiento centralizado, de acuerdo con el Reglamento (CEE) nº 2309/93. La solicitud debe ir acompañada de toda la información que se detalla en los artículos 8 a 12: Datos administrativos y composición del medicamento (artículo 8), condiciones en las que el fabricante no tendrá obligación de presentar resultados de las pruebas toxicológicas o farmacológicas del medicamento (artículo 10), la información que debe incluir el resumen de las características del producto, denominado ficha técnica del medicamento (artículo 11) y sus características farmacológicas y clínicas (artículo 12).

El Capítulo 3 especifica los plazos de que dispone el EM para estudiar la documentación del solicitante. En los art. 23 a 26 se especifica la validez de 5 años, renovables, para una autorización aprobada, así como cuándo una solicitud podrá ser denegada.

Tabla 1. Resumen de la Directiva 2001/83/CE.

DIRECTIVA 2001/83/CE		
Título	Denominación	Artículos
I	DEFINICIONES	1
II	ÁMBITO DE APLICACIÓN	2 a 5
III	COMERCIALIZACIÓN	
	Capítulo 1: Autorización de comercialización	6 a 12
	Capítulo 2: Disposiciones particulares aplicables a los medicamentos homeopáticos	13 a 16
	Capítulo 3: Procedimiento relativo a la autorización de comercialización	17 a 26
	Capítulo 4: Reconocimiento mutuo de autorizaciones	27 a 39
IV	FABRICACIÓN E IMPORTACIÓN	40 a 53
V	ETIQUETADO Y PROSPECTO	54 a 69
VI	CLASIFICACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS	70 a 75
VII	DISTRIBUCIÓN AL POR MAYOR DE MEDICAMENTOS	76 a 85
VIII	PUBLICIDAD	86 a 100
IX	FARMACOVIGILANCIA	101 a 108
X	DISPOSICIONES PARTICULARES RELATIVAS A LOS MEDICAMENTOS DERIVADOS DE LA SANGRE Y DEL PLASMA HUMANOS	109 a 110
XI	VIGILANCIA Y SANCIONES	111 a 119
XII	COMITÉ PERMANENTE	120 a 121
XIII	DISPOSICIONES GENERALES	122 a 127
XIV	DISPOSICIONES FINALES	128 a 130
ANEXO I	Normas y protocolos analíticos, tóxico-farmacológicos y clínicos en materia de ensayos de medicamentos	
ANEXO II	Directivas derogadas (Parte A) y lista de plazos de transposición al Derecho nacional (Parte B)	
ANEXO III	Cuadro de correspondencias con disposiciones anteriores.	

El Capítulo 4 establece un Comité de especialidades farmacéuticas, para facilitar las decisiones comunes de los EM sobre la autorización de comercialización, remarcando los criterios científicos de calidad, seguridad y eficacia en que deben basarse. El Comité está adscrito a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA).

A partir del artículo 28, la Directiva señala los procedimientos para evitar la duplicidad de la evaluación de solicitudes presentadas en varios EM a la vez, mediante la elaboración de un informe por parte del primer EM que estudie la solicitud y la aceptación de este

informe de evaluación por el resto de los EM.

El Título IV se refiere a la necesidad de disponer de una autorización de fabricación para todos los medicamentos elaborados en el territorio de la UE, incluso cuando sean para su posterior exportación. De especial importancia es el artículo 47, que requiere respetar las prácticas de correcta de fabricación (habitualmente llamadas BPF's), que se establecen en la Directiva 2003/94/CE de la Comisión (2). También se definen las obligaciones del titular de la autorización de fabricación, así como de la cualificación de la persona designada como responsable (capítulos 48 a 52).

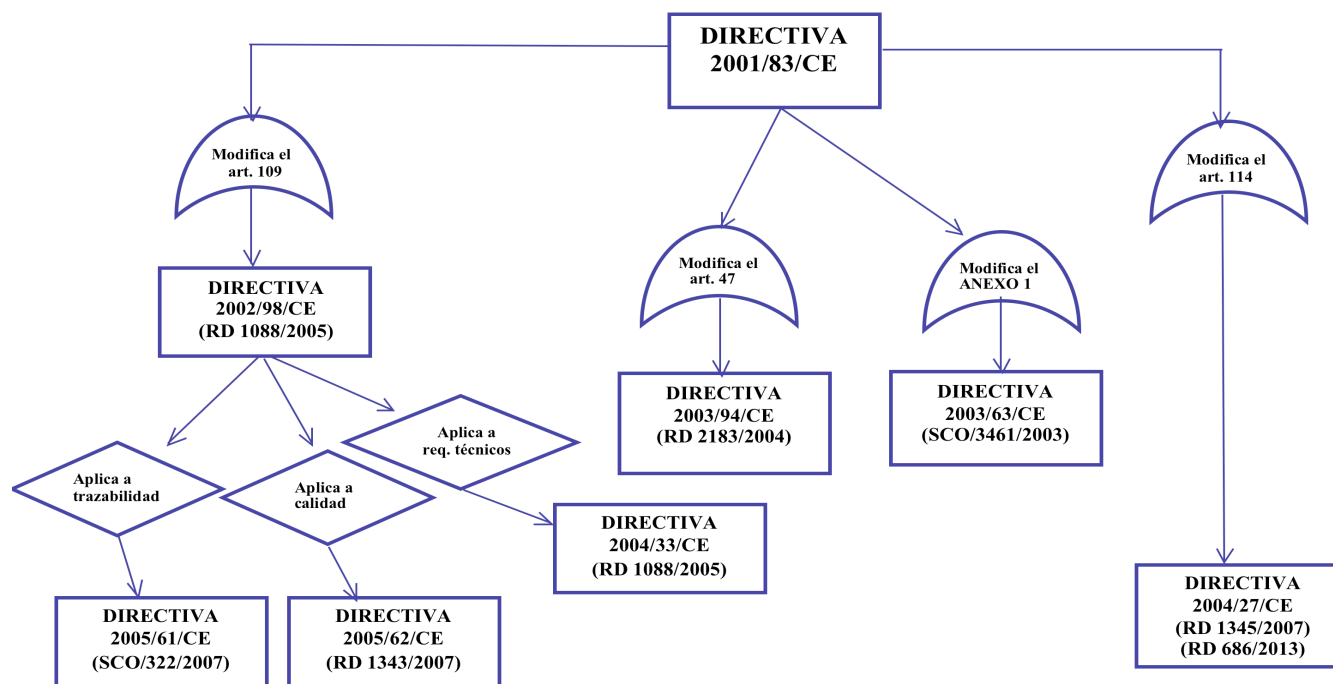


Figura 2. Evolución de la normativa europea aplicable a medicamentos hemoderivados y su transposición a la española (Reales Decretos, RD y Orden Ministerial, SCO).

El Título V define la información que debe incluirse en el etiquetado, acondicionamiento primario, prospecto y embalaje exterior del medicamento, incluyendo la necesidad de redactar estas indicaciones en la lengua o lenguas oficiales del EM donde vaya a comercializarse.

En el Título VI se indican los criterios de clasificación de los medicamentos, en sujetos o no a receta médica.

El Título VII sólo permite que se distribuyan medicamentos con autorización de comercialización, y establece que su distribución está sujeta a la posesión de una autorización para ejercer la actividad de mayorista de medicamentos. Un mayorista debe disponer de instalaciones y locales aptos para la buena conservación y distribución de los medicamentos, y de personal adecuado y cualificado para realizar las funciones establecidas por el EM. En cuanto al suministro de medicamentos a farmacéuticos o personal autorizado para su dispensación al público, los EM se comprometen a no endurecer las obligaciones impuestas para sí mismos. Pueden existir requisitos más estrictos para la distribución al por mayor de medicamentos derivados de la sangre, así como de sustancias narcóticas o psicotrópicas, medicamentos inmunológicos y medicamentos radiofármacos.

El Título VIII define el término de publicidad de medicamentos e indica las particularidades según la publicidad sea dirigida al público o a los profesionales que los prescriben o dispensan.

El Título IX trata de la Farmacovigilancia, indicando que los EM pueden obligar a los médicos y otros profesionales sanitarios a informar de cualquier

reacción adversa grave o inesperada que haya podido producirse. El artículo 103 obliga al titular de la comercialización a disponer de una persona responsable de la farmacovigilancia de sus medicamentos, debidamente cualificada. El artículo 104 pormenoriza los procedimientos para notificar cualquier reacción adversa grave que se haya producido en España o en el territorio de un tercer país. El artículo 106 requiere a la Comisión que, para facilitar el intercambio de información, elabore orientaciones sobre la realización de los correspondientes informes. El Título X se refiere exclusivamente a las disposiciones particulares para los medicamentos derivados de la sangre y del plasma humanos. Consta de dos artículos: 109 y 110, donde se indica que, *en lo que concierne a la utilización de sangre o plasma humano en tanto que materias primas para la fabricación de medicamentos, los EM adoptarán las medidas necesarias para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas.* También se menciona la aplicación de las monografías de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), a las que nos referiremos más adelante, que apliquen a estos medicamentos, incluyendo lo concerniente al plasma, además de las recomendaciones del Consejo de Europa y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en lo que respecta particularmente a la selección y comprobación de los donantes de sangre y plasma.

Los puntos 2 y 3 del artículo 109 señalan que *los EM tomarán todas las medidas útiles para que los donantes y los centros de extracción de la sangre y el plasma humanos sean siempre claramente identificables. Además, deberán asegurarse todas las garantías de seguridad mencionadas en los apartados 1 y 2 para la*

importación de sangre y plasma humanos proveniente de terceros países.

Según el artículo 110, *los EM adoptarán todas las medidas necesarias para promover el autoabastecimiento de la Comunidad de sangre o plasma humanos. Deben estimularse las donaciones de sangre o de plasma voluntarias y no remuneradas y adoptarán todas las medidas necesarias para el desarrollo de la producción posterior y de la utilización de medicamentos derivados de sangre o plasma humanos procedentes de donaciones voluntarias y no remuneradas. Comunicarán las medidas adoptadas a la Comisión.*

El artículo 109 fue posteriormente modificado por la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (3), *por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes.*

Esta nueva Directiva, denominada habitualmente como “Directiva de la Sangre”, define todos los términos relacionados con la transfusión, incluido los centros y servicios de transfusión. Considera que *la donación de sangre voluntaria y no remunerada constituye un factor que puede contribuir a conseguir altos niveles de seguridad de la sangre y sus componentes y, por lo tanto, a la protección de la salud humana. En particular, un EM podrá establecer requisitos para las donaciones voluntarias y no remuneradas, que incluyan la prohibición o restricción de las importaciones de sangre y sus componentes.*

La Directiva 2002/98/CE *aplica a la extracción y verificación de la sangre humana o sus componentes, sea cual sea su destino, así como a su tratamiento, almacenamiento y distribución cuando el destino sea la transfusión.* Para verificar el cumplimiento de los requisitos que establece esta Directiva, los EM velarán por que las autoridades realicen inspecciones y controles adecuados en los centros de transfusión sanguínea. Los centros de transfusión mantendrán un sistema de calidad que siga los principios de buenas prácticas, y la Comisión establecerá las normas y especificaciones de las actividades incluidas en el mismo.

Por lo que respecta a la hemovigilancia, el artículo 14 sobre trazabilidad, indica que *los EM adoptarán las medidas necesarias para garantizar el seguimiento desde el donante al receptor, y viceversa, de la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento, conformidad y distribución de sangre y de sus componentes que tengan lugar en su territorio.* Para ello, los centros de transfusión dispondrán de un sistema de identificación de cualquier donación de sangre y de cada unidad de sangre y de componentes sanguíneos que permita la trazabilidad hasta el donante y, del mismo modo, hasta la transfusión y el receptor. Este sistema de trazabilidad también se aplicará a la sangre y sus componentes importados de terceros países. El etiquetado de la sangre o de sus componentes debe seguir un sistema de identificación

definido en el Anexo III de esta Directiva. Todos los datos que permiten garantizar la trazabilidad se conservarán un mínimo de 30 años.

Por lo que se refiere a la protección de los datos, el capítulo VII, en su artículo 24, establece que todos los datos a los que tengan acceso terceras partes, deben convertirse en anónimos para que el donante no pueda ser identificado por ellas. Los datos se protegerán para evitar posibles modificaciones no autorizadas de los registros de los donantes, sin menoscabo de la trazabilidad de las donaciones.

Los controles analíticos que deben realizarse en las donaciones de sangre total y plasma quedan definidos en el Anexo IV: *grupo ABO y Rh D (no necesario para plasma para fraccionamiento) y detección de las siguientes infecciones en los donantes: Hepatitis B (HBs-Ag), Hepatitis C (Anti HCV) y VIH ½ (Anti-HIV ½). Para determinados componentes o donantes o situaciones epidemiológicas concretas pueden ser necesarias otras pruebas adicionales.*

Volviendo a la Directiva 2001/83/CE, el Título XI, en su artículo 111, indica que las autoridades competentes de los EM comprobarán el cumplimiento de las normas mediante inspecciones periódicas a los centros de fabricación de los medicamentos, donde *podrán tomar muestras e informarse de todos los documentos relacionados con el objeto de las inspecciones.*

Un aspecto específico y exclusivo de los medicamentos inmunológicos y de los hemoderivados es la liberación de cada lote de fabricación por un laboratorio estatal, lo cual se denomina **liberación oficial de lote**. En efecto, el artículo 114, en el punto 1, indica cómo, cuando se considere necesario para el interés de la Salud Pública, *los EM podrán exigir que el titular de la autorización de comercialización de vacunas vivas, medicamentos inmunológicos utilizados para la inmunización primaria de niños u otros grupos de riesgo, utilizados en programas de inmunización de Salud Pública o aquellos que sean nuevos o hayan sido fabricados con técnicas nuevas o modificadas, someta al control de un laboratorio estatal muestras de cada lote del producto a granel y/o medicamento, antes de su comercialización.* Lo mismo queda descrito en el apartado 2 del artículo 114 pero con respecto a los medicamentos derivados de sangre o plasma humanos. En el caso de los hemoderivados, el producto a granel es la mezcla de plasma que se utiliza como material de partida para la fabricación de cada lote, que se denomina habitualmente como “pool de plasma”. No será necesario realizar estos análisis si ya hubiesen sido hechos previamente por otro EM, cumpliendo las especificaciones aprobadas en el país receptor. Estos análisis deberán concluir en un plazo máximo de 60 días a partir de la recepción de las muestras. A este respecto, posteriormente, la Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (4), modifica la Directiva 2001/83/CE, incluyendo en su ámbito de aplicación el

plasma elaborado mediante un proceso industrial y modificando los términos de “un laboratorio estatal o de un laboratorio designado a este efecto” por “un laboratorio oficial de control de medicamentos o un laboratorio designado por un EM a tal efecto”.

La Directiva 2001/83/CE, por tanto, permite, aunque no requiere, que los laboratorios estatales realicen controles de cada lote de pool de plasma y de producto terminado en los hemoderivados antes de su puesta en el mercado; es decir, son las autoridades estatales competentes las que deciden si este sistema de liberación oficial es obligatorio y, en su caso, emiten un certificado de liberación de lote cuando los resultados son satisfactorios. Es lo que se conoce como Liberación Oficial de Lote de la Autoridad de Control (“Official Control Authority Batch Release”, OCABR) (5). Actualmente, la gran mayoría de los EM, incluyendo España, así lo requieren. Además, dado que es una medida adicional de seguridad, muchos terceros países que importan de la UE estos productos, exigen este certificado. En el caso de los hemoderivados, los controles analíticos consisten en los marcadores virales de VHB, VHC y VIH, en el plasma, así como varios ensayos de actividad y seguridad en el producto final. También ha de revisarse la documentación de producción y control del fabricante de cada lote. Los controles analíticos del pool de plasma se realizan en la mezcla homogénea de unidades de plasma, material de partida de la fabricación de cada lote.

El artículo 115 establece que, en el caso de medicamentos derivados de sangre o plasma humanos, los procedimientos de fabricación deberán estar *validados adecuadamente, proporcionen homogeneidad entre lotes y garanticen, en la medida en que lo permita el estado de la técnica, la ausencia de contaminación vírica específica*. Los fabricantes tendrán que comunicar *el método que utiliza para reducir o eliminar los virus patógenos que puedan transmitirse por los medicamentos derivados de sangre o plasma humanos. Las autoridades competentes podrán enviar muestras del producto a granel y/o medicamento para su estudio a un laboratorio estatal o en un laboratorio designado a este efecto, bien durante el examen de la solicitud o bien después de haber concedido la autorización de comercialización*.

Los artículos 116 y 117 disponen que una autorización de comercialización puede ser suspendida o retirada si el medicamento es nocivo, carece de efectos terapéuticos, no posee la composición cuantitativa y cualitativa declarada, o si la información recogida en el expediente es errónea, o no se han realizado los controles descritos.

El Título XII se refiere al Comité permanente que asiste a la Comisión *para adaptar al progreso técnico las Directivas dirigidas a la supresión de los obstáculos técnicos en los intercambios en el sector de los medicamentos*.

El Título XIII, en sus disposiciones generales, indica

las relaciones que deben mantener los EM para compartir la información relativa a sus requisitos para la autorización de fabricación o de comercialización de medicamentos.

En el Anexo I se indican los datos y documentos que deben acompañar a los expedientes para solicitar la autorización de comercialización de medicamentos, de acuerdo con las directrices comunitarias de calidad, seguridad y eficacia. Este anexo ha sido modificado por el anexo I de la Directiva 2003/63/CE de la Comisión (6). En él se describe el contenido del expediente, una vez que en el marco de la Conferencia internacional sobre armonización del año 2000 se llegó a acordar un formato y una terminología armonizados en un documento técnico común (DTC). Un DTC consta, de acuerdo con esta directiva, de cinco módulos: el primero es la información administrativa, el resumen de las características del producto, etiquetado y prospecto, información sobre los expertos que han realizado el DTC, así como una evaluación del riesgo para el medio ambiente. El segundo módulo contiene el resumen de los datos químicos, farmacéuticos y biológicos. El módulo 3 incluye la información química, farmacéutica y biológica del principio activo y del medicamento terminado. Los módulos 4 y 5 describen los estudios no clínicos y clínicos, respectivamente.

La Directiva considera que, *en el caso de los medicamentos biológicos, se entenderá por materiales de partida toda sustancia de origen biológico, tales como los microorganismos, órganos y tejidos de origen vegetal o animal, las células o fluidos (incluyendo sangre y plasma) de origen humano o animal y los diseños celulares biotecnológicos (sustratos celulares, sean o no recombinantes, incluidas las células primarias)*. Por lo que se refiere a los procesos de fabricación de este tipo de principios activos, *los materiales de siembra, los bancos de células, las mezclas de suero o plasma sin elaborar y demás materias de origen biológico, así como, siempre que sea posible, los materiales de los que se hayan obtenido, deberán someterse a ensayos para comprobar que están libres de agentes extraños externos. Más específicamente, cuando se trate de medicamentos derivados de la sangre o del plasma humano, deberán describirse y documentarse el origen y los criterios de recogida, transporte y conservación de los materiales de partida*.

En el caso de los hemoderivados, como medicamentos de origen biológico, se utilizarán materiales de referencia biológicos de la Ph. Eur. Su seguridad depende del control riguroso de sus materiales de partida y de una fabricación basada en el manejo cuidadoso del plasma humano como material de partida.

A pesar de lo dispuesto previamente acerca de los materiales de partida y materias primas, en medicamentos derivados de la sangre humana, toda esta información podrá ser sustituida por un “Archivo Principal sobre Plasma” (APP). Este archivo es definido

en la Directiva como “aquella documentación independiente y separada del expediente de autorización de comercialización que contenga toda la información pormenorizada pertinente sobre las características de todo el plasma humano empleado como material de partida y/o materia prima para la fabricación de subfracciones o fracciones, componentes del excipiente y principio(s) activo(s)”. Su objetivo ha sido no repetir toda la documentación sobre el plasma en cada de uno los hemoderivados afectados, asegurando la consistencia en toda la UE. La certificación de un APP se realiza de la misma forma que en un procedimiento centralizado. Aunque es un sistema opcional, por sus grandes ventajas todos los fabricantes de hemoderivados lo utilizan, a diferencia del caso de las vacunas. El APP se debe certificar de nuevo cada año, con las modificaciones que hubiera.

En la Directiva 2004/33/CE de la Comisión (7) por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE se indican los requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos, teniendo en cuenta la Recomendación 98/463/CE del Consejo, sobre la idoneidad de los donantes de sangre y de plasma y el cribado de las donaciones de sangre de la CE, recomendaciones del Consejo de Europa, el dictamen del Comité científico de medicamentos y dispositivos médicos, las monografías de la Ph. Eur., especialmente en lo que concierne a la utilización de sangre o hemoderivados como materias primas para la fabricación de medicamentos, las recomendaciones de la OMS y la experiencia internacional en este ámbito. La sangre y los componentes sanguíneos importados de terceros países también deberán cumplir dichos requisitos técnicos. En los Anexos II a V de la Directiva se describen las pruebas y procedimientos que se contemplan y los EM garantizarán la validación de todos ellos.

La Directiva 2005/61/CE de la Comisión (8), aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo relativo a los requisitos de trazabilidad y a la notificación de reacciones y efectos adversos graves. En los Anexos se definen las reacciones adversas graves que puedan producirse así como los formularios de notificación de dichos efectos adversos.

La Directiva 2005/62/CE de la Comisión (9) aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las normas y especificaciones comunitarias relativas a un sistema de calidad para los centros de transfusión sanguínea. Se define, en este sentido, que el sistema de calidad debe englobar los principios de gestión de la calidad, aseguramiento y mejora continua de la calidad e incluye al personal, los locales y el equipo, la documentación, la extracción, la verificación, el tratamiento, el almacenamiento y la distribución, la gestión de contratos, la no conformidad y la autoinspección, el control de calidad, la retirada de componentes sanguíneos y las auditorías externa e interna.

2. AGENCIA EUROPEA DE MEDICAMENTOS

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) es el organismo responsable de la evaluación científica de los medicamentos desarrollados por compañías farmacéuticas para uso en la UE. Aunque en julio de 1993 se publicó el REGLAMENTO (CEE) N° 2309/93 del Consejo por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y supervisión de medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la EMA (www.ema.europa.eu), no fue hasta 1995 cuando empieza a funcionar, con sede en Londres. (10). Sus funciones son coordinar y organizar el sistema de autorizaciones de medicamentos en Europa. Su creación ha permitido armonizar los requerimientos necesarios para autorizar medicamentos, en la UE y países asociados. En concreto, se crean el denominado “procedimiento centralizado”, obligado para los medicamentos biotecnológicos, y el “descentralizado” o “de reconocimiento mutuo”. En el procedimiento centralizado se autoriza un medicamento en todos los países de la UE a la vez, y en el procedimiento de reconocimiento mutuo se extiende la autorización de un EM a otros. En todo caso, la EMA coordina la evaluación pero son los expertos de las Agencias Nacionales quienes la realizan. Quedan a decisión de cada EM el precio del medicamento y su posible financiación por los sistemas de salud.

Anteriormente, en 1977 y 1981, respectivamente, se crearon los Comités de Medicamentos de Uso Humano (CPMP, posteriormente CHMP) y de Medicamentos Veterinarios (CVMP), formados por representantes de todos los EM y de la Comisión y que emiten dictámenes consultivos sobre las solicitudes de comercialización. La decisión final es de la Comisión Europea. Por otra parte, los medicamentos que se van a comercializar en un solo país pueden seguir autorizándose por la vía nacional tradicional, excepto los biotecnológicos. Por tanto, en el caso de los hemoderivados, si se fabrican utilizando biotecnología, deben autorizarse por vía centralizada mientras que los de origen plasmático y fabricación no biotecnológica pueden autorizarse por cualquiera de las tres vías: nacional, centralizada o reconocimiento mutuo.

Además, los comités citados son los encargados de aprobar las directrices o “guidelines” elaboradas y actualizadas por grupos de trabajo, las cuales son “disposiciones de carácter no obligatorio basadas en los conocimientos científicos del momento sobre un aspecto en concreto”. Las directrices no son instrumentos jurídicos ya que no obligan a su cumplimiento, aunque cuando un solicitante decide no seguirlas tiene que justificar la decisión tomada. Su carácter no obligatorio permite mantener la flexibilidad y evitar impedimentos al desarrollo científico. Las directrices se publican en la página web de la EMA. En el campo de los hemoderivados, existen varias directrices que cubren tanto aspectos generales como específicos de los hemoderivados, respecto a su producción y control

(Tabla 2).

Tabla 2. Directrices específicas de hemoderivados.

Título	Numero de referencia	Entrada en vigor
Plasma-derived medicinal products	CPMP/BWP/706271/2010 (11)	Febrero 2012
Position statement on non-remunerated and remunerated donors: Safety and supply of plasma-derived medicinal products	CPMP/BWP/1818/02 (12)	Mayo 2002
Position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products	CHMP/BWP/303353/2010 (13)	Junio 2011
Investigation of manufacturing processes for plasma-derived medicinal products with regard to variant Creutzfeldt-Jakob disease risk	CPMP/BWP/5136/03 (14)	Octubre 2004
Scientific data requirements for plasma master file	CHMP/BWP/3794/03 Rev. 1 (15)	Junio 2007
Requirements for plasma master file certification	CPMP/BWP/4663/03 (16)	Marzo 2004
Epidemiological data on blood transmissible infections (plasma master file)	CHMP/BWP/548524/2008 (17)	Marzo 2011
Warning on transmissible agents in summary of product characteristics (SmPCs) and package leaflets for plasma-derived medicinal products	CHMP/BWP/360642/2010 (18)	Julio 2012

3. FARMACOPEA Y LABORATORIOS OFICIALES DE CONTROL

Las Farmacopeas son compendios de normas legalmente reconocidas que establecen la calidad de los medicamentos. La Ph. Eur., creada en el seno del Consejo de Europa en 1964 para facilitar la circulación de medicamentos, supuso la unificación de las farmacopeas nacionales. Inicialmente, ocho Estados firmaron el Convenio para su elaboración, pero actualmente lo han firmado 37 EM's y la Comisión Europea. La Directiva 2001/83 indica que la Ph. Eur. es de obligado cumplimiento para todos los productos que figuren en ella, teniendo por tanto carácter supranacional.

La Ph. Eur. es por tanto el organismo de referencia para el control de calidad de los medicamentos de los estados signatarios de la Convención. Las normas oficiales publicadas en ella proporcionan una base legal y científica para el control de calidad durante los procesos de desarrollo, fabricación y comercialización. Estas normas se refieren a la composición cualitativa y cuantitativa así como a las pruebas que se deben realizar en los medicamentos, en las materias primas utilizadas en su producción y en la síntesis de los intermedios (19). Todos los productores de medicamentos o de sustancias activas deben aplicar estas normas de calidad para comercializar sus productos en los países signatarios.

Las misiones de la Ph. Eur. son:

- Promover la salud pública mediante normas comunes reconocidas para su uso por los profesionales de la salud y cualquier persona interesada en la calidad de los medicamentos.
- Facilitar la libre circulación de los medicamentos en Europa.
- Garantizar la calidad de los medicamentos o de cualquiera de sus componentes importados o exportados desde Europa.
- Diseñar las monografías y cualquier texto adecuado a las necesidades de las autoridades reguladoras, para todos aquellos aspectos relacionados con el control de la calidad de los medicamentos y de sus componentes, así como para los fabricantes de las materias primas y sus productos.

La Ph. Eur. requiere ser implantada en los países que firmaron el Convenio para elaborarla. En el caso de España, ello se realiza mediante la publicación de la Real Farmacopea Española (20), que incluye todos los textos de la Farmacopea Europea, traducidos a la lengua española bajo la responsabilidad de la AEMPS, y monografías particulares españolas (actualmente, sólo está la correspondiente a la Merbromina). Se regula por la Ley 25 del Medicamento (21), el RD 294/1995 (22) y el RD 249/2001 (23) que modifica el anterior.

La Dirección Europea de Calidad del Medicamento

(EDQM), creada en 1996, es una Dirección del Consejo de Europa, cuya misión es proteger la Salud Pública mediante el desarrollo, el mantenimiento y la monitorización de la aplicación de estándares de calidad que permitan disponer de medicamentos seguros.

El EDQM tiene a su cargo:

- 1.- La Secretaría Técnica de la Comisión Europea de Farmacopea.
- 2.- La publicación y la distribución de la Ph. Eur.
- 3.- La preparación y distribución de las sustancias químicas y biológicas de referencia.
- 4.- La certificación de conformidad con las monografías de la farmacopea europea.
- 5.- La red europea de Laboratorios Oficiales de Control de medicamentos (OMCL's).

El organigrama del EDQM se presenta en la Figura 3.

El EDQM está supervisado por un grupo asesor constituido por seis representantes (tres para las vacunas y tres para productos relacionados con sangre) de los distintos EM. Anualmente celebra una reunión plenaria para revisar las actividades de cada año. Como requiere la Directiva 2001/83/CE, los laboratorios estatales son los encargados de realizar la liberación oficial de lote, si el país decide implantar este sistema. El laboratorio oficial de control -OMCL- es la autoridad competente de cada país en el control de medicamentos. Estos controles no serán repetidos cuando ya otro EM lo haya realizado y haya declarado que cumple las especificaciones aprobadas. Para los controles descritos deben utilizarse las monografías de la Ph. Eur., además de cualquier normativa recomendada por el Consejo de Europa y la OMS.

La red de OMCL's es el foro para el intercambio de información confidencial sobre la calidad técnica y los

medicamentos humanos biológicos así como sobre los métodos de control relacionados. Esta red coordina la aplicación del procedimiento europeo de liberación oficial de lote (OCABR). Se encarga de hacer las directrices de cada medicamento con los ensayos a realizar para su liberación. Conforme a lo dispuesto por la Comisión Europea, el EDQM actúa como su secretaría para la Farmacopea. La Red de OMCL's celebra una reunión anual de coordinación y revisión del sistema OCABR.

El procedimiento OCABR afecta a los EM de la UE / EEE y también se aplica por cualquier Estado que haya firmado un acuerdo formal con la UE, incluyendo el reconocimiento de OCABR. Terceros países que no pertenecen a la UE también lo solicitan cuando importan medicamentos hemoderivados o vacunas, de la UE, como una medida de seguridad adicional. Países como Suiza, Israel y Canadá lo aplican a través de diferentes acuerdos de Reconocimiento Mutuo.

Por lo que se refiere a los medicamentos hemoderivados, existen directrices específicas elaboradas por el EDQM para la liberación de lotes de: mezclas de plasma utilizado para la fabricación de medicamentos, albúmina humana, inmunoglobulina humana y factores de coagulación, inhibidores de plasma y sellantes de fibrina (24).

Las autoridades nacionales emiten un certificado de liberación oficial de lote europeo cuando los resultados del lote analizado son satisfactorios. Todos los EM están obligados a reconocer el certificado emitido por cualquier otro EM; esto significa que los lotes liberados por las autoridades competentes de un EM son válidos en todos los demás.

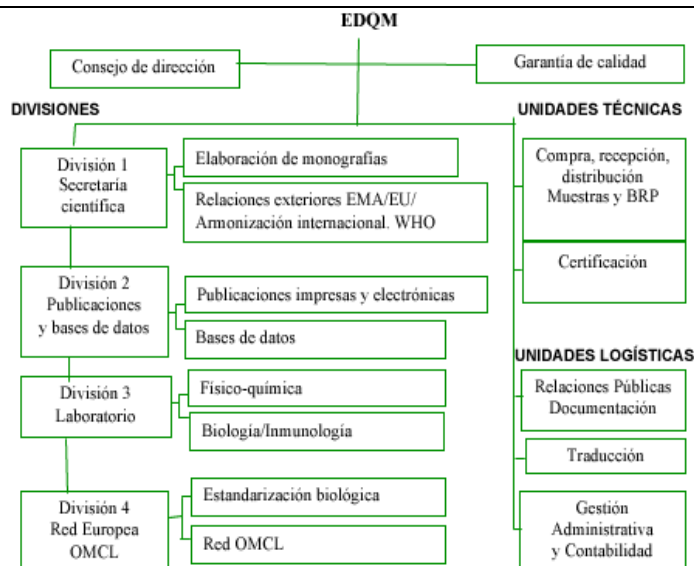


Figura 3. Organigrama del EDQM.

4. REGULACIÓN ESPAÑOLA

La legislación española relativa a los medicamentos derivados de sangre y plasma humanos es la que se detalla a continuación:

-La Ley 29/2006 (25), *de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios*. Deroga la ley 25/1990 del Medicamento y tiene como finalidad la mejora del funcionamiento del mercado interior de los medicamentos pero sin olvidar la protección de la salud.

-La Ley 10/2013 (26), incorpora al ordenamiento jurídico español la Directiva 2010/84/UE (27), sobre Farmacovigilancia y la Directiva 2011/62/UE (28), sobre prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal.

-El Real Decreto (RD) 1345/2007 (29) regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. Este RD transpone a la legislación española la Directiva 2001/83/CE y sus posteriores modificaciones (ver Figura 1). Posteriormente ha sido modificado por el RD 686/2013 (30), actualizando la regulación vigente. En la Sección 1ª (MEDICAMENTOS HEMODERIVADOS) del capítulo IV de este RD, en el artículo 41 se indica que cada lote de fabricación de producto terminado debe ser liberado antes de su comercialización. Se exceptúan, entre otros, los derivados plasmáticos que se utilicen como excipientes o reactivos en la producción de otro medicamento o producto sanitario. La autorización previa de cada lote de fabricación consistirá en la realización de ensayos analíticos junto a la revisión de los protocolos de producción y control, enviados por el titular de la autorización. El plazo máximo para la resolución es de 60 días desde la fecha de su presentación. Si los resultados analíticos son correctos, se emite el certificado de liberación de acuerdo con el sistema europeo (OCABR). Si el lote ha sido certificado por otro EM, se autoriza sin realizar análisis.

-El RD 1088/2005 (31) establece los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. Reúne en un único texto la normativa española relativa a la hemodonación y requisitos técnicos, e incorpora al ordenamiento jurídico español la Directiva 2002/98/CE y la Directiva 2004/33/CE.

-El RD 2183/2004 (32) modifica el RD 1564/1992, que desarrolla y regula el régimen de autorización de los laboratorios farmacéuticos y de los importadores de medicamentos y la garantía de calidad en su fabricación industrial. También incorpora en el ordenamiento jurídico español la Directiva 2003/94/CE. Amplia el ámbito de aplicación del real decreto a los medicamentos en investigación de uso humano y modifica el capítulo VI, para que las prácticas correctas de fabricación sean aplicables a los medicamentos en investigación de uso humano y a los medicamentos para exportación.

-El RD 1343/2007 (33) establece normas y

especificaciones relativas al sistema de calidad de los centros y servicios de transfusión. Transpone la Directiva 2005/62/CE, por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE en lo que se refiere a normas de calidad.

-La Orden SCO/3461/2003 (34) actualiza el anexo II del RD 767/1993, por el que se regula la evaluación, autorización, registro y condiciones de dispensación de especialidades farmacéuticas y otros medicamentos de uso humano. También incorpora al ordenamiento jurídico la Directiva 2003/63/CE de la Comisión.

-Finalmente la Orden SCO/322/2007 (35) establece los requisitos de trazabilidad y de notificación de reacciones y efectos adversos graves de la sangre y de los componentes sanguíneos. Incorpora al ordenamiento jurídico interior la Directiva 2005/61/CE.

En el caso de España, el laboratorio oficial responsable de la liberación oficial de lote, como consta en la lista de contactos del procedimiento de OCABR, es la División de Productos Biológicos y Biotecnología de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

5. ASPECTOS DE CALIDAD

Para acreditar el procedimiento OCABR, los laboratorios oficiales de control deben tener un sistema de aseguramiento de la calidad, basado en la norma internacional UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. *Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración* y que sustituye a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2000.

En España, la entidad nacional de acreditación es ENAC (www.enac.es), que realiza las siguientes actividades:

- Declara la competencia técnica de los evaluadores de la conformidad.
- Promueve la aceptación internacional de las actividades de los evaluadores de la conformidad acreditados.
- Colabora con la Administración y otras organizaciones usuarias de la acreditación.
- Gestiona el sistema de acreditación.
- Promueve y difunde los procedimientos y criterios de acreditación facilitando el acceso de los evaluadores de la conformidad a la acreditación.
- Colabora con las instituciones y organizaciones nacionales e internacionales en los aspectos relacionados con sus objetivos y fines.

En Europa, el reconocimiento de los organismos de acreditación por las autoridades está establecido en el artículo 11 del Reglamento (CE) nº 765/2008 que establece los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado: “Las autoridades nacionales reconocerán la equivalencia de los servicios prestados por los organismos de acreditación [...] y aceptarán de ese modo [...] los certificados de acreditación de dichos organismos y las certificaciones emitidas por los

organismos de evaluación de la conformidad acreditados por ellos”.

En la AEMPS, en el Departamento de Medicamentos de Uso Humano, el Laboratorio de Hemoderivados de la División de Productos Biológicos y Biotecnología está acreditado por ENAC según la norma ISO/IEC 17025:2005 desde Enero de 2004, para las técnicas necesarias para realizar la liberación de lote europeo de acuerdo con el procedimiento OCABR para productos derivados de plasma y hemoderivados tales como el Factor VIII, la albúmina e inmunoglobulinas. Así mismo, el Laboratorio de Virología de la misma División está acreditado para las técnicas de marcadores virales en las mezclas de plasma. En este marco, la AEMPS emite certificados europeos de liberación oficial de lote, de plasma y de producto final de hemoderivados para otros países, tanto países europeos que lo requieren como para terceros países que lo solicitan como una medida adicional de seguridad.

6. COMENTARIOS ADICIONALES

La normativa comentada ha ido incorporando nuevas medidas de seguridad que han permitido que los medicamentos hemoderivados sean cada vez más seguros (36, 37, 38). Sin embargo, la regulación europea insiste en la donación altruista como objetivo prioritario, basando la seguridad en la no remuneración. No obstante, la EMA ha emitido un posicionamiento (12) indicando que no hay evidencia, a partir de los estudios clínicos y de farmacovigilancia, de que la remuneración de los donantes incrementa el riesgo de transmisión viral por estos medicamentos, y que su seguridad depende de la aplicación de una serie de medidas complementarias.

Por otra parte, ni en España ni en la mayoría de los países europeos está resuelta la autosuficiencia en medicamentos hemoderivados y es necesario importar plasma, cuyo origen es mayoritariamente de donantes remunerados (39). Actualmente, en España estamos muy lejos de alcanzar la capacidad de autosuficiencia de plasma para la fabricación de medicamentos derivados del plasma (esencialmente albúmina, inmunoglobulinas y factores de coagulación). Por ello, si bien es recomendable promover y mejorar la política de donación voluntaria y no remunerada (DVNR) en el sistema transfusional, como indica la Directiva 2002/98, resulta por completo irrealizable el incorporar el objetivo de autosuficiencia en base a la DVNR recomendado por la OMS para los derivados plasmáticos. En efecto, teniendo en cuenta que la DVNR es mayoritariamente de sangre total, se obtendría un exceso de componentes lábiles; es decir, que para los productos hemoderivados habría que estimular la práctica de la plasmaféresis únicamente, sin donación de sangre total. Las características de la plasmaféresis requieren donaciones de más larga duración y mucho más frecuentes y está demostrado que dicha práctica se vincula a la remuneración. Es importante subrayar que a día de hoy todos los derivados plasmáticos fabricados con plasma de

origen no español y utilizados en nuestro país, que representan según los productos entre más de la mitad y hasta dos tercios de los derivados, provienen de plasma remunerado/compensado, tanto de países europeos (Alemania y Austria principalmente) como de EEUU. La dependencia actual va además en aumento, porque la necesidad de productos se incrementa mientras que no lo hace el volumen de plasma de origen español enviado a la industria (40). Igualmente, la mayor parte del plasma hiperinmune con el que se producen las inmunoglobulinas específicas, procede también de la donación retribuida.

En este sentido, el sistema de plasmaféresis, con donación frecuente, permitiría medidas adicionales de seguridad como la no utilización del plasma en la fabricación hasta obtener una donación posterior con marcadores virales negativos. Por estos motivos, en la realidad actual y en los próximos años, no se puede prescindir de la donación remunerada/compensada. Ello dejaría sin tratamiento a más de la mitad de pacientes que necesitan derivados plasmáticos. Resulta por tanto más recomendable, exclusivamente para obtener derivados plasmáticos (no para uso transfusional, como en el caso de trasplante de órganos), incentivar en España este tipo de donación, como ya existe en otros países europeos (en particular, en Austria y Alemania), en vez de depender, y de manera creciente, del plasma remunerado que procede de estos países y de EEUU. Por ello en nuestra opinión, cualquier política de autosuficiencia en derivados plasmáticos pasa por la promoción de la plasmaféresis remunerada.

7. CONCLUSIÓN

La armonización y la mejora continua de la normativa europea ha sido crítica para la seguridad de los pacientes crónicos tratados con medicamentos hemoderivados y, por tanto, relevante para la Salud Pública. La revisión y análisis del marco legal y de las directrices que afectan a los hemoderivados, presentados en este trabajo, constituyen una herramienta eficaz para el entendimiento y utilización de esta normativa tan compleja y extensa, por parte de los profesionales sanitarios, de la industria farmacéutica y de los reguladores.

8. REFERENCIAS.

1. Dir. 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001.
Disponible en:
(<http://www.boe.es/doue/2001/311/L00067-00128.pdf>).
2. Dir. 2003/94/CE de la Comisión de 8 de octubre de 2003.
Disponible en:
(<http://www.boe.es/doue/2003/262/L00022-00026.pdf>).
3. Dir. 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 2003.

- Disponible en: (<http://www.boe.es/doue/2003/033/L00030-00040.pdf>).
4. Dir. 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004.
Disponible en: (<http://www.boe.es/doue/2004/136/L00034-00057.pdf>).
5. Documentos OCABR.
Disponible en: (<http://www.edqm.eu/en/human-biologicals-611.html>).
6. Dir. 2003/63/CE de la Comisión, de 25 de junio de 2003.
Disponible en: (<http://www.boe.es/doue/2003/159/L00046-00094.pdf>).
7. Dir. 2004/33/CE de la Comisión de 22 de marzo de 2004.
Disponible en: (<http://www.boe.es/doue/2004/091/L00025-00039.pdf>).
8. Dir. 2005/61/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005.
Disponible en: (<http://www.boe.es/doue/2005/256/L00032-00040.pdf>).
9. Dir. 2005/62/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005.
Disponible en: (<http://www.boe.es/doue/2005/256/L00041-00048.pdf>).
10. Timón M y Ruiz S. Bases regulatorias de los medicamentos de origen biotecnológico. Rev Esp Econ Salud 2007; 6 (6): 346-351.
11. European Medicines Agency. Plasma-derived medicinal products. CPMP/BWP/706271/2010. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109627.pdf).
12. European Medicines Agency. Position statement on non-remunerated and remunerated donors: Safety and supply of plasma-derived medicinal products. EMEA/CPMP/BWP/1818/02/Final.2002. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003794.pdf).
13. European Medicines Agency. Position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products. CHMP/BWP/303353/2010. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Position_statement/2011/06/WC500108071.pdf).
14. European Medicines Agency. Investigation of manufacturing processes for plasma-derived medicinal products with regard to variant Creutzfeldt-Jakob disease risk. CPMP/BWP/5136/03. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003741.pdf).
15. European Medicines Agency. Scientific data requirements for plasma master file. CHMP/BWP/3794/03 Rev. 1. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003663.pdf).
16. European Medicines Agency. Requirements for plasma master file certification. CHMP/BWP/4663/03. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003747.pdf).
17. European Medicines Agency. Epidemiological data on blood transmissible infections (plasma master file). CHMP/BWP/548524/2008. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/10/WC500097728.pdf).
18. European Medicines Agency. Warning on transmissible agents in summary of product characteristics (SmPCs) and package leaflets for plasma-derived medicinal products. CHMP/BWP/360642/2010. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/12/WC500119001.pdf).
19. Medicamentos hemoderivados: Análisis comparativo de las exigencias actuales de calidad de las Farmacopeas Americana y Europea. Alonso C, Ballesteros J, García A, Massot M, Montoro JB, Montoro J, Rodríguez MC, Vardulaki A. O.F.I.L. 2001; (3):1144-1163.
20. de la Morena C. Curso presentación en el Curso de especialización "Farmacia Industrial y Galénica. Farmacopea Europea y Real farmacopea Española". Universidad de Alcalá de Henares. 2014.
21. Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento. Disponible en: (<https://www.boe.es/boe/dias/1990/12/22/pdfs/A38228-38246.pdf>).
22. Real Decreto 294/1995, de 24 de febrero. Disponible en: (<https://www.boe.es/buscar/pdf/1995/BOE-A-1995-8877-consolidado.pdf>).
23. Real Decreto 249/2001, de 9 de marzo. Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2001/03/10/pdfs/A08975-08977.pdf>).

Regulatory framework for human medicinal products

24. Guías para la liberación europea de lotes. Disponible en: (<http://www.edqm.eu/en/Human-OCABR-Guidelines1530.html>). [actualizada el 1 de agosto de 2014; fecha de acceso: 25 de agosto de 2014].
25. Ley 29/2006, de 26 de julio.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2006/07/27/pdfs/A28122-28165.pdf>).
26. Ley 10/2013, de 24 de julio.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2013/07/25/pdfs/BOE-A-2013-8083.pdf>).
27. Dir. 2010/84/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010.
Disponible en: (http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2010_84/dir_2010_84_es.pdf).
28. Dir. 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010.
Disponible en: (http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2011_62/dir_2011_62_es.pdf).
29. RD 1345/2007, de 11 de octubre.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2007/11/07/pdfs/A45652-45698.pdf>).
30. RD 686/2013, de 16 de septiembre.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2013/09/17/pdfs/BOE-A-2013-9638.pdf>).
31. RD 1088/2005, de 16 de septiembre.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2005/09/20/pdfs/A31288-31304.pdf>).
32. RD 2183/2004, de 12 de noviembre.
Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2004/11/13/pdfs/A37514-37517.pdf>
33. RD 1343/2007, de 11 de octubre.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2007/11/01/pdfs/A44626-44631.pdf>).
34. SCO 3461/2003, de 26 de noviembre.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2003/12/12/pdfs/A44292-44316.pdf>).
35. SCO/322/2007, de 9 de febrero.
Disponible en: (<http://www.boe.es/boe/dias/2007/02/17/pdfs/A07010-07016.pdf>).
36. Valverde López JL, Risquez Madrdeijos JP y Cabezas López M^ªD. El concepto jurídico de la sangre y sus derivados desde la perspectiva del derecho comunitario y español. *Ars Pharmaceutica* 1999; 40 (3): 131-141.
37. Consensus opinion for the selection and use of therapeutic products for the treatment of haemophilia in Spain. Batlle J ; Villar A; Liras A; Alonso C; Altisent C; Brito D; Moreno ML; Lucia F; Sedano C; Prieto ML; Calvente N; Aznar J A; Jimenez V; Soriano V; Martorell J R; Iruin G; Bergua J M; Aguilar C. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19 : 333-340.
38. Seguridad de los concentrados plasmáticos y recombinantes. Alonso C. *Journal of Hematology* 2000; 85(1): 20-27.
39. Mascaretti L, James V, Barbara J, Cárdenas JM, Blagoevska M and Haracic M. Comparative analysis of national regulations concerning blood safety across Europe. *Transfusion Med* 2004; 14: 105-111.
40. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Informe: Hemofilia. Aspectos organizativos. Noviembre 2012. Disponible en: (http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/Hemofilia_AspectosOrganizativos.pdf).



Taste masking in oral solid dosage forms

Title in Spanish: *Enmascaramiento de sabores en formas farmacéuticas sólidas orales*

Espada García, J. I.¹, Fernandes Tavares, D. F.¹, Fraguas Sánchez, A. I.², Aparicio Blanco, J.², Martín Sabroso, C.²; Torres Suárez, A.I.^{2,3*}

¹Tedec Meiji Farma, Ctra. M-300 Km 30,5, Alcalá de Henares, 28802 Madrid. ²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. ³Instituto Universitario de Farmacia Industrial, Universidad Complutense de Madrid

ABSTRACT: Despite being traditionally associated with oral liquid dosage forms, taste masking as critical attribute in the formulation of drug products has recently experienced a renaissance, mostly due to the development of oral solid dosage forms aimed at achieving disintegration either under *ex vivo* conditions or even more relevantly into the oral cavity. Not only does taste masking involve the neutralization of the potential unpleasant flavour inherent to the drug substance, but also seeks to achieve tasty flavour in the final drug product, since it has influence both to a sanitary extent (the higher the patient acceptance, the better the patient compliance) and to an economical extent (since the flavour of a marketed product can make the difference between commercial success or commercial failure). The purpose of this review is to outline the strategies likely to be applied in taste masking of oral solid dosage forms, to sort out and describe the major flavour-modifying agents in the pharmaceutical field, as well as to compile comprehensively testing techniques of the efficacy of the various taste masking strategies. Consequently, this review adds to the scope of taste masking a further dimension, serving thus as a proof-of-concept that much remains still to be said in this area.

RESUMEN: Aunque tradicionalmente ligado a formas farmacéuticas líquidas orales, el enmascaramiento del sabor como parámetro crítico en la formulación de medicamentos ha cobrado recientemente un nuevo auge en respuesta al desarrollo de formas farmacéuticas sólidas orales que persiguen una disgregación, bien *ex vivo*, bien en la cavidad bucal. El enmascaramiento no sólo comprende la neutralización del potencial sabor desagradable inherente al principio activo, sino también la obtención de un sabor agradable en la formulación final, con repercusión tanto a nivel sanitario, puesto que cuanto mayor sea la aceptación por parte del paciente, mayor será su adherencia al tratamiento; como a nivel económico, ya que el sabor del producto puede marcar la diferencia entre el éxito y el fracaso comercial. Mediante esta revisión se ponen de relieve las estrategias aplicables en el enmascaramiento de sabores de formas farmacéuticas sólidas orales, se clasifican y describen los principales excipientes correctores del sabor, así como se efectúa una compilación exhaustiva de las técnicas de evaluación de la eficacia de los distintos recursos empleados en el enmascaramiento del sabor desagradable. De esta forma, se amplía el ámbito de aplicación del concepto enmascaramiento del sabor, demostrándose que es un área del cual aún hay mucho por decir.

*Corresponding Author: galaaaa@farm.ucm.es

Received: Mars 3, 2015 Accepted: July 3, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 116-128

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

El sabor siempre ha sido una característica crítica para el desarrollo de formas farmacéuticas líquidas. Sin embargo, actualmente, debido a la expansión de formas farmacéuticas sólidas de disgregación previa a la administración o en la boca, el sabor se ha convertido en un parámetro crítico también en las formas sólidas (1,2). No sólo se trata de enmascarar un sabor desagradable, sino que además se debe aportar a la formulación un sabor agradable que aumente la aceptación del paciente (3).

Algunos ejemplos de formas farmacéuticas sólidas en las que obtener un sabor adecuado constituye un elemento crítico en la formulación son los comprimidos bucodispersables, masticables, sublinguales, dispersables,

solubles y efervescentes. En la Tabla 1 se valora la importancia del sabor en el desarrollo de distintos tipos de comprimidos. En estas formas farmacéuticas el sabor no sólo influye en la aceptación por parte del paciente, y por consiguiente, en el cumplimiento del tratamiento, sino también en aspectos de marketing del producto, ya que a veces una correcta elección del sabor del producto puede marcar la diferencia entre el éxito y el fracaso comercial (4-6). La tendencia, cada vez más, es realizar concienzudos estudios sobre el sabor de la formulación, tanto en el impacto inicial en la boca, como en el gusto durante la disgregación y en el sabor final. No se trata de que la formulación no sepa mal, sino que resulte agradable al paladar durante el tiempo que ésta se encuentra en la cavidad bucal (7).

Taste masking in oral solid dosage forms

Como se ha comentado anteriormente, los comprimidos bucodispersables y masticables se diseñan con el fin de que la disgregación se produzca en la cavidad bucal, bien de forma rápida y espontánea al entrar en contacto con la saliva, o bien debido a la acción mecánica de la masticación (8-10). Generalmente, como consecuencia de la disgregación del comprimido se produce la liberación del principio activo, que se podrá absorber tanto a nivel del epitelio bucofaringeo como gastrointestinal.

En los últimos años ha crecido el interés en el desarrollo de este tipo de comprimidos como una alternativa a los comprimidos convencionales (2). Estos comprimidos combinan las ventajas de las formas líquidas y de las formas sólidas orales, pues presentan la exactitud

en la uniformidad de dosificación características de forma sólidas, permitiendo además una fácil deglución como las formas líquidas (10).

En el desarrollo farmacéutico de estos comprimidos junto a los factores críticos de formulación característicos de formas farmacéuticas sólidas orales (velocidad de disolución, estabilidad al estado sólido y fluidez), hay que considerar los requisitos de sabor y sensación agradable en la boca (11,12).

En el caso de los comprimidos sublinguales, están diseñados para que la liberación y absorción del principio activo se produzca en la boca. Con el fin de evitar la deglución, resulta crítico en su formulación enmascarar el sabor del principio activo manteniendo la formulación final con un sabor neutro.

Tabla 1. Importancia del sabor en el desarrollo de distintos tipos de comprimidos.

Tipo de comprimido	Lugar de disgregación	Tiempo máximo de disgregación (RFE)	Importancia del sabor en la formulación
Convencional no recubierto	Estómago	15 minutos	(+)
Convencional recubierto	Estómago	60 minutos	(-)
Gastrorresistente	Estómago	60 minutos	(-)
Bucodispersable	Cavidad bucal	3 minutos	(++++)
Masticable	Cavidad bucal	-	(++++)
Sublingual	Cavidad bucal	-	(++++)
Dispersable	Ex vivo	3 minutos	(++)
Soluble	Ex vivo	3 minutos	(++)
Efervescente	Ex vivo	5 minutos	(++)

2. DESARROLLO DE FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS A PARTIR DE PRINCIPIOS ACTIVOS CON SABOR DESAGRADABLE

El farmacéutico formulador debe establecer una serie de criterios básicos que le lleven a conseguir un gusto adecuado de la forma farmacéutica que está desarrollando. En un intento de sistematizar el procedimiento de corrección del sabor de un principio activo, podemos dividir éste en tres etapas:

2.1. Análisis de las características del principio activo

En un primer acercamiento se debe evaluar las características organolépticas del principio activo aislado, como sabor, aroma característico o textura en la boca, obteniendo una impresión general del mismo. Hay cinco cualidades del sabor básicas (dulce, salado, ácido, amargo y umami o sabroso), percibidas por receptores especializados de la lengua y otras partes de la cavidad

bucal. Prácticamente todas las cualidades gustativas primarias se pueden percibir en todas las zonas de la lengua, pero hay regiones de máxima sensibilidad para cada una de ellas, siendo en el caso del sabor dulce la punta de la lengua, en el sabor amargo la parte posterior, en el umami la zona central, en el ácido la parte lateral y en el salado, tanto la punta como las regiones laterales (5,13).

La Tabla 2 muestra las concentraciones umbrales de detección para el sabor dulce, amargo, ácido y salado (5,14).

Determinadas estructuras químicas se asocian con sabores característicos, como por ejemplo, las sales de ácidos orgánicos que tienen cierto carácter agrio, las lactonas, glucósidos, aminor y alcaloides que presentan sabor amargo o las estructuras terpénicas, como el mentol, eugenol, o eucaliptol, que muestran un cierto efecto refrescante y desensibilizante. En el caso de los azúcares, existe una correlación entre el número de grupos -OH y el poder edulcorante que presentan (5).

Tabla 2. Concentraciones umbrales de detección del sabor dulce, salado, ácido y amargo.

Cualidad Gustativa Primaria	Concentración umbral (%)
Dulce (Sacarosa)	0.5
Salado (Cloruro sódico)	0.25
Ácido (Ácido clohídrico)	0.007
Amargo (Quinina)	0.00005

2.2. Enmascaramiento del sabor

Se trata de enmascarar el sabor de los principios activos con sabor desagradable, sin aportar a la formulación ningún sabor específico. Para ello se usan distintas técnicas que se desarrollan con más extensión posteriormente.

Se encuadra en la etapa de formulación, dentro del desarrollo farmacéutico del nuevo medicamento, donde se deben preparar al menos dos formulaciones con métodos de enmascaramiento distintos. Estas formulaciones “sin sabor” constituyen la línea por la que continuar el desarrollo y establecer el sabor adecuado.

Como se ha comentado, esta etapa es fundamental en el desarrollo de comprimidos sublinguales, en los que se prescinde, habitualmente, de la incorporación de saborizantes.

Una vez conseguido el enmascaramiento, es decir, un sabor neutro, se llega a la última fase.

2.3. Incorporación de excipientes con sabor agradable

Una vez se tiene una formulación con sabor neutro, la incorporación de edulcorantes, saborizantes y esencias en proporciones adecuadas aportan el sabor final deseado.

Hay veces que la etapa de enmascaramiento de sabores no resulta necesaria como tal, ya que la utilización de saborizantes específicos contrarresta con bastante éxito sabores desagradables específicos de algunos principios activos.

3. FACTORES A CONSIDERAR EN LA ELECCIÓN DEL SABOR FINAL DEL MEDICAMENTO

Para elegir el sabor final de una formulación se han de tener en cuenta múltiples factores, considerando la población diana a la cual se dirige nuestro producto y siguiendo las indicaciones del departamento de marketing del laboratorio. Algunos de estos factores son los siguientes:

3.1. Relacionados con el uso terapéutico del medicamento

- Indicación terapéutica: muchas indicaciones están asociadas a determinados sabores, como por ejemplo, los complejos multivitamínicos que se asocian a sabores cítricos, o los antigripales que se asocian con anís.

- Frecuencia de administración: en el caso de tratamientos crónicos, es importante no causar “cansancio” en el paciente con sabores demasiado marcados, pues esto podría llevar a una menor adherencia al tratamiento.

- Pacientes a los que va dirigido el producto: las preferencias en cuanto a sabor de la población a la que va dirigido el medicamento es otro factor a tener en cuenta, principalmente en niños y ancianos. En el caso de la población pediátrica, diversos estudios han demostrado que los niños tienen una mayor preferencia por sabores dulces y salados que los adultos, lo que probablemente, es un reflejo de los mayores requerimientos energéticos que necesitan durante los períodos de máximo crecimiento, pues muchos de los alimentos ricos en energía, como la leche materna o la fruta, presentan sabor dulce (13,15). En la población geriátrica hay que tener en cuenta que se produce una pérdida general de la agudeza del sabor (16), mostrando una preferencia por sabores cítricos y mentolados.

- La comercialización del medicamento como publicitario (EFP) o sujeto a prescripción médica es otro factor a tener en cuenta, ya que si es un medicamento publicitario el sabor va a ser clave para diferenciarlo del resto de productos similares y lograr que este tenga una mejor aceptación, pero si se trata de medicamentos sujetos a prescripción médica el sabor no va a ser tan importante a la hora de la elección por parte del paciente, aunque sí que puede llegar a condicionar la adherencia al tratamiento.

3.2. Relacionados con la composición del medicamento

- Sabor del principio activo a contrarrestar. Se puede establecer una posible relación entre el sabor del principio activo y el recomendado para la formulación, utilizándose para ello distintos correctores de sabor. Estos correctores se añaden en función del tipo de sabor de la sustancia activa (dulce, amargo, ácido o salado), ya que cada saborizante mejora un tipo concreto de sabor. En la Tabla 3 se recogen los principales correctores de sabor recomendados en función del sabor del principio activo.

El enmascaramiento del sabor es esencial en el caso de principios activos amargos, como por ejemplo macrólidos, penicilinas y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), pues su sabor desagradable puede condicionar la adherencia al tratamiento. En humanos los receptores del sabor amargo están codificados por 25 genes diferentes

(17,18). Estos receptores son capaces de identificar una gran variedad de sustancias, desde iones hasta compuestos polifenólicos o pequeños péptidos, e incluso pequeños cambios en la estructura molecular de muchos compuestos, como la isomería D,L de los aminoácidos, puede modificar su sabor. Mientras que algunos receptores del sabor amargo están especializados en detectar unos pocos compuestos, como es el caso de la feniltiocarbamida que activa un solo receptor, otras sustancias activan múltiples receptores. Este es el caso de la quinina, que activa hasta 9 receptores diferentes del sabor amargo (17,19).

Sin embargo, hay casos más complejos en los que el sabor detectado inicialmente se ve sustituido por otro con el tiempo. Por ejemplo, ciertos antiácidos como el almagato dejan una sensación desagradable (de “tiza”) en

la boca, mientras que ciertas vitaminas dejan un gusto picante. En estos casos se pueden emplear dos sabores, uno primero durante la disgregación y un segundo que se mantenga más en el tiempo para evitar este regusto. Generalmente, la vainilla u otros sabores cremosos dan buenos resultados.

- Elementos de la propia formulación: Se debe tener en cuenta que ciertos constituyentes de la propia formulación van a potenciar los efectos de los saborizantes o edulcorantes que se encuentren en la misma. Es el caso de los polioles (manitol, sorbitol), que potencian el sabor refrescante de la hierbabuena o menta, de ciertos ácidos como el tartárico, que potencian el efecto de sabores cítricos o de la sacarina sódica, cuyo sabor metálico final puede potenciar el sabor de principios activos amargos.

Tabla 3. Sabores recomendados en función del sabor del principio activo.

Sabor base del principio activo	Sabor recomendado
Dulce	Fresa, uva, frutas del bosque, miel, vainilla
Ácido	Cítricos, anís, mora, frambuesa, regaliz, cereza
Amargo	Anís, menta, café, chocolate, cereza, naranja
Salado	Melón, mezcla de cítricos, canela, nuez, sirope de caramelo
Alcalino	Menta, crema, vainilla, natillas.
Metálico	Lima, uva, frambuesa, menta

4. TÉCNICAS DE NEUTRALIZACIÓN DE SABORES

En los últimos años se han desarrollado un importante número de técnicas empleadas para el enmascaramiento de sabores. Este aumento en el número de técnicas ha ido estrechamente ligado con el auge de las formulaciones en las que el sabor es un punto crítico. A continuación se pasa a describir las principales:

4.1. Formación de diferentes sales y derivados

En este método se busca una modificación química en la molécula de principio activo con la que se obtenga una mejora sustancial en su sabor. Al tratarse de un cambio en la estructura del principio activo, se tendrán que realizar exhaustivos estudios de preformulación, ya que otras características críticas para el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas orales, como la velocidad de disolución o la fluidez, pueden verse modificadas por el cambio químico.

4.2. Uso de aminoácidos e hidrolizados de proteínas

La combinación de aminoácidos, sus sales o ambos consigue sobre todo con ciertos antibióticos, como por

ejemplo la penicilina, enmascarar su marcado sabor amargo. Los aminoácidos más usados con este fin suelen ser: alanina, taurina, ácido glutámico y en especial, glicina. Se cree que el mecanismo por el que estos aminoácidos mejoran el sabor de la formulación está en su alta afinidad por los receptores del gusto, bloqueando la actividad del principio activo sobre ellos (20).

4.3. Incorporación de excipientes absorbentes

Los principios activos con un sabor desagradable pueden ser enmascarados si se adsorben con sustratos que los aíslan de las papilas gustativas de la cavidad bucal, permitiendo su liberación una vez se encuentran en el estómago o en el intestino. Un ejemplo de esto es el hidrobromuro de dextrometorfano, de reconocido sabor amargo, que se adsorbe con un sustrato de trisilicato de magnesio enmascarando su sabor (21,22). Este complejo de sustrato y principio activo generalmente se comercializa en forma de polvo micronizado. Como adsorbentes encontramos sustancias muy diferentes, entre las que se encuentran: bentonita, gel de sílice o los silicatos de magnesio y aluminio (22-24). La formación del adsorbato generalmente implica disolver el principio activo junto con el sustrato en un disolvente, evaporando posteriormente el

solvente y dejando como residuo el principio activo adsorbido a la superficie del sustrato. Las principales variables del proceso a tener en cuenta son: la elección del sustrato y del solvente, las condiciones de mezclado de ambos, la temperatura y el grado de evaporación. Todos estos parámetros deben ser optimizados para obtener el resultado deseado.

4.4 Incorporación de resinas de intercambio iónico

Esta técnica posee algunas similitudes con la anterior. El sustrato empleado es una resina de naturaleza iónica (catiónica o aniónica), que posee afinidad por el principio activo, un electrolito que presenta carga contraria (22). Teóricamente esta unión de la molécula a enmascarar con la resina de carga opuesta es lo suficientemente fuerte como para mantenerse durante la disgregación del comprimido en la cavidad bucal.

No solo se ha utilizado para enmascarar sabores indeseados del principio activo, sino que también permite mejorar la estabilidad de un principio activo en formulaciones dispersables (22,25). Un ejemplo de esto son las formulaciones de complejos vitamínicos, en las que al pH de la cavidad bucal la vitamina B12 se encuentra unida a una resina de intercambio iónico para evitar su degradación ácida en presencia de vitamina C, aumentando así la estabilidad de la formulación. De esta manera, se consiguen dos objetivos en la formulación, enmascarar un sabor desagradable a la par que aumentar la estabilidad del medicamento.

4.5 Granulación por vía húmeda

Este es el primer y más simple método que se emplea a la hora de intentar enmascarar el sabor de un principio activo que se somete a granulación (22). Se suele emplear una solución aglutinante en la cual se encuentran polímeros como la povidona, polimetacrilatos o derivados de celulosa (HPMC, HPMCP), así como ciertos mucílagos, que al ser granulados junto con el principio activo y por el propio mecanismo de la granulación crean una fina película que recubre el principio activo y aumentan la viscosidad tras la disgregación. Por ambos motivos disminuye la superficie de contacto del principio activo con los receptores del gusto (26).

4.6 Aplicación de recubrimientos

En el caso de comprimidos destinados tanto a la disgregación *ex vivo* como en la cavidad bucal no tiene sentido tratar de enmascarar sabores desagradables mediante un recubrimiento del comprimido entero, ya que la eliminación de dicho recubrimiento habría de producirse como muy tarde a nivel de la cavidad bucal, perdiendo así las propiedades de enmascaramiento del sabor precisamente al nivel al cual se destinaba su uso. Sin embargo, en el caso de comprimidos bucodispersables y masticables (de entre los mencionados los únicos que por definición pueden retardar la presencia del principio activo en solución a segmentos del tubo digestivo posteriores a la cavidad bucal), sí se puede plantear la aplicación de

recubrimientos a los gránulos resultantes de la disgregación de los mismos. Con este fin se contempla el empleo de pellets recubiertos o de minigránulos. La forma más habitual de efectuar estos recubrimientos es mediante la incorporación de un recubrimiento polimérico pH-dependiente, aprovechando las propiedades de disolución diferencial de numerosos polímeros comerciales a distintos pHs. La situación ideal contempla la presencia del recubrimiento a nivel de la cavidad bucal, así como la posterior liberación completa del principio activo a niveles posteriores del tubo digestivo para no alterar la biodisponibilidad, hecho que condiciona la selección del material polimérico de recubrimiento. De entre los polímeros que presentan una solubilidad pH dependiente los más utilizados en tecnología farmacéutica son los derivados del ácido metacrílico, disponibles bajo el nombre comercial de Eudragit®. Insoluble al pH de la saliva, pero soluble al pH del estómago se encuentra Eudragit® E, polímero de recubrimiento insoluble a pHs superiores a 5. En el caso de principios activos que se degradan a pH ácido, su liberación deberá retardarse aún más mediante el empleo de un segundo recubrimiento insoluble al pH gástrico (éste es el caso del Eudragit® L, polímero de recubrimiento insoluble a pHs inferiores a 6) (5).

4.6.a Pellets

Se pueden elaborar pellets recubiertos utilizando polímeros insolubles al pH de la saliva pero solubles al pH del estómago. Normalmente el recubrimiento se aplica mediante la técnica del lecho fluido, bien sobre pellets obtenidos previamente por extrusión, o más frecuentemente en una última etapa de la elaboración de pellets por formación de capas a partir de un núcleo inerte, y se obtiene una mayor eficacia en el enmascaramiento del sabor.

4.6.b Microencapsulación

Se trata de un método de recubrimiento de partículas o gotas de líquido con los mencionados materiales poliméricos o grasas que al recubrir el principio activo evitan el contacto de éste con las papilas gustativas, enmascarando así cualquier sabor desagradable (27-30). Las microcápsulas presentan un tamaño que puede oscilar entre 5 y 5000 μm . Existen numerosos métodos para la elaboración de estas micropartículas, pero las técnicas de coacervación y de atomización son las más utilizadas para administración por vía oral.

Las microcápsulas no solamente van a enmascarar el sabor desagradable del principio activo, sino que minimizan cualquier incompatibilidad que pueda existir entre este y otros constituyentes de la formulación. Este método se puede usar con múltiples principios activos de características muy dispares. Los materiales que se emplean más frecuentemente a la hora de formar las microcápsulas son carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, acetofalato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, gelatina-acacia y algunos tipos de ceras. La elección de

uno u otro depende de las necesidades particulares de cada formulación. Estas microcápsulas una vez obtenidas se mezclan con excipientes típicos para la obtención de comprimidos por compresión directa, es decir, diluyentes, lubricantes, disgregantes, edulcorantes... (22). El comprimido se disgrega en la boca y quedan libres las micropartículas.

Un aspecto crítico de esta técnica de enmascaramiento, es que durante la compresión la fuerza ejercida por los punzones puede provocar la ruptura de la cubierta de las microcápsulas y, por tanto, una disminución en su eficacia a la hora de enmascarar sabores. Además, el tiempo que la forma farmacéutica permanece en la boca hasta que se disgrega, así como una masticación excesiva de aquella pueden conllevar la pérdida de la cubierta y la aparición del sabor desagradable, especialmente con principios activos muy amargos. Otro aspecto que se debe tener en cuenta es la textura que deben presentar los comprimidos bucodispersables y masticables una vez se disgreguen en la cavidad bucal. En este punto, juega un papel fundamental el tamaño de las microcápsulas: en general tamaños de partícula que pasan por un tamiz de luz de malla menor de 200 μm se consideran adecuados ya que tamaños mayores podrían dar lugar a una sensación granulosa dentro de la boca o a que se produjera una ruptura mecánica por la masticación.

Otros puntos que hacen de esta técnica útil para el enmascaramiento de sabores son la reproducibilidad una vez optimizada la técnica, la existencia de un amplio abanico de polímeros de recubrimiento y el fácil control del tamaño de las partículas obtenidas.

Esta técnica puede ser empleada, por ejemplo, para el enmascaramiento del sabor de ciertos antibióticos como la dicloxacilina sódica o las tetraciclinas. Se obtienen las micropartículas mediante la técnica de atomización, utilizando como recubrimiento una mezcla de etilcelulosa junto con ceras disueltas en cloruro de metileno. El antibiótico micronizado se suspende en esta solución. La mezcla se atomiza en una cámara donde circula aire caliente que produce la evaporación del solvente, obteniéndose un producto con unas características adecuadas para su posterior compresión junto con los excipientes apropiados. También se emplea en el caso del recubrimiento de vitaminas liposolubles como la vitamina A y D, o hidrosolubles como tiamina, riboflavina, niacina y piridoxina. Para recubrir éstas últimas se emplea una variante de la técnica de atomización descrita anteriormente: la atomización/solidificación, en la que se utilizan ácidos grasos en forma de monoglicéridos y diglicéridos fundidos. En general la proporción de ácido graso y vitamina suele ser de 3 a 1. Se debe estudiar la posible influencia de este recubrimiento en la biodisponibilidad del principio activo, siendo esto último una prioridad frente a la mejora del sabor obtenida. Además de los ácidos grasos anteriormente citados, diversas formulaciones han empleado también polietilenglicoles (PEG) de pesos moleculares comprendidos entre 4000 y 20000. En general estos PEG

poseen mejores características físicas y de estabilidad.

4.7 Empleo de ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que presentan una cavidad central lipófila y un exterior hidrófilo. Gracias a este interior lipófilo pueden formar complejos de inclusión con un alto número de sustancias (31). Esta capacidad de formar complejos tiene diversas aplicaciones en tecnología farmacéutica, como por ejemplo el enmascaramiento de sabores (32). Sin embargo, el uso de ciclodextrinas queda restringido a principios activos que formen complejos con una elevada constante de unión o alta estabilidad, debido a que una baja estabilidad del complejo podría causar una rápida liberación del principio activo en la cavidad bucal resultando un método de enmascaramiento ineficiente (31-33).

La β -ciclodextrina es la más empleada para la formación de complejos de inclusión. Se ha utilizado por ejemplo como técnica de enmascaramiento de numerosos fármacos como la hexetidina, levosulpirida y el zipeprol (22).

5. EXCIPIENTES CORRECTORES DEL SABOR

Una vez enmascarado el sabor del principio activo, el sabor final de la formulación dependerá de la incorporación de excipientes que pueden ser de dos tipos: diluyentes dulces y saborizantes.

5.1 Diluyentes dulces

Los diluyentes son los excipientes mayoritarios en la formulación de comprimidos. En el caso de principios activos con alta potencia pueden llegar a representar el 90% del peso final del comprimido. Por este motivo es muy importante el sabor del diluyente a la hora de desarrollar comprimidos que se disgregan antes de su ingestión, especialmente, en el caso de comprimidos bucodispersables y masticables, ya que al disgregarse deben dejar un sabor y una sensación agradable en la boca. Por ello, ciertos azúcares (sobre todo los polioles) son los candidatos ideales para realizar la función de diluyentes, ya que producen una sensación refrescante y dulce en contacto con los receptores del gusto.

Al ser el diluyente, como se ha comentado anteriormente, el componente mayoritario de la formulación, es importante a la hora del desarrollo de una formulación de comprimidos conocer también sus características de compresibilidad y su relación con los tiempos de disgregación. Estos factores son especialmente importantes en el desarrollo de comprimidos bucodispersables, ya que junto con el sabor y textura agradable han de presentar tiempos de disgregación en la cavidad bucal inferiores a 3 minutos, y preferiblemente inferiores a 1 minuto si se quieren desarrollar los denominados “fast dissolving/disintegrating tablets”.

Otra característica deseable en estos diluyentes es una alta solubilidad en medio acuoso, ya que permite por un lado, la rápida penetración del medio de ataque hacia el

interior de comprimido y su posterior disgregación/disolución, y por otro, da lugar a un residuo muy pequeño o nulo tras la disgregación en la boca, mejorando la sensación al paladar. En la Tabla 4 se

encuentran recogidos los principales diluyentes utilizados en la elaboración de comprimidos, clasificados en función de su solubilidad en agua.

Tabla 4. Diluyentes empleados en la elaboración de comprimidos.

SOLUBLES	INSOLUBLES
Lactosa	Sulfato cálcico
Sacarosa	Fosfato cálcico dibásico
Manitol	Sulfato cálcico tribásico
Dextrosa	Almidón
Sorbitol	Almidones hidrolizados
Fructosa	Celulosa microcristalina
Cloruro sódico	Celulosas "floc"

Atendiendo a las características particulares que necesita la formulación de comprimidos bucodispersables mediante compresión (ya sea por compresión directa o granulación por vía húmeda), es decir una adecuada resistencia a la fractura frente a una rápida disgregación, buena solubilidad y un gusto adecuado al paladar, los diluyentes que presentan mejores características son:

5.1.a. Manitol

Es el diluyente dulce más utilizado en formulaciones masticables y en comprimidos bucodispersables. Se trata de un poliol que se presenta en forma de sólido pulverulento, sin olor y sabor dulce, con un poder edulcorante de 0,5 y una entalpía de disolución negativa, por lo que al disolverse da sensación de frescor en la boca (34). Se trata de un azúcar no cariogénico y con un bajo valor calórico, por lo que se puede emplear en niños y en personas con problemas dentarios.

Es prácticamente inerte y no higroscópico, y se utiliza tanto en compresión directa como en granulación por vía húmeda (35), ya que se comercializan formas tanto granulares como con menor tamaño de partícula. El Pearlitol 200SD es un ejemplo de manitol como excipiente de compresión directa y el Pearlitol C de granulación por vía húmeda. En general, cuando se granula suele necesitar mayor cantidad de solución aglutinante que otros azúcares como la lactosa o sacarosa.

Sus propiedades de flujo no son demasiado buenas y suele necesitar altas cantidades de lubricante, que pueden aumentar los tiempos de disgregación, y de antiadherentes. Presenta buenas propiedades plásticas, de manera que se obtienen elevados valores de resistencia a la rotura a partir de moderadas presiones de compresión.

5.1.b. Sorbitol

Es un isómero óptico del manitol, bastante empleado

en la formulación de comprimidos masticables y bucodispersables. Posee un poder edulcorante ligeramente mayor que el manitol de 0,6, y también es refrescante (34), aportando su disolución una sensación agradable en la cavidad bucal como efecto de su calor negativo de solución. No presenta propiedades cariogénicas, pudiéndose por lo tanto emplear también en niños. Se comercializa en distintas formas aptas para granulación por vía húmeda y/o compresión directa (34).

Presenta una mayor higroscopicidad y solubilidad que el manitol. Esta higroscopicidad puede alterar mucho sus propiedades de flujo, pudiendo dar problemas de adherencia a los punzones de la máquina de comprimir.

5.1.c. Sacarosa

Es un disacárido formado por α -glucopiranososa y β -fructofuranosa utilizado fundamentalmente como diluyente. Destaca por su alto poder edulcorante, siendo de hecho uno de los edulcorantes más utilizados no sólo a nivel farmacéutico. Posee propiedades aglutinantes cuando se utiliza para procesos de granulación por vía húmeda (34).

Los intentos de uso por compresión directa siempre han sido infructuosos, pero existen en el mercado distintas modificaciones que han mejorado sus características. Un ejemplo de estas modificaciones sería el Di-Pac (97% sacarosa y 3% dextrinas modificadas), que posee buena capacidad de flujo, aunque esta propiedad puede verse modificada por la humedad ambiental, que se debe considerar como un factor crítico cuando se utilice este derivado de sacarosa por compresión directa. En efecto, cuando la humedad ambiental es mayor del 50 %, además de empeorar su fluidez, la compresibilidad de la formulación puede verse seriamente comprometida, debido a que el agua puede formar películas alrededor de los cristales de sacarosa e impedir la formación de fuerzas

interparticulares durante la compresión.

Otro tipo de sacarosa modificada es Mannitab, compuesta por sacarosa y un 4% de azúcar invertido, junto con una pequeña cantidad de almidón y estearato magnésico. Esta sacarosa modificada se caracteriza por tener un efecto refrescante en contacto con la boca en comparación con otras (35).

5.1.d. Lactosa

Es un disacárido formado por β -D-galactopiranososa y β -D-glucopiranososa. Es el azúcar contenido en la leche y uno de los diluyentes más empleados (34). Posee un menor poder edulcorante y una menor solubilidad en comparación con otros azúcares empleados como diluyentes.

La principal forma comercializada es la α -lactosa monohidrato, que como diluyente para compresión se encuentra en forma cristalina para granulación, o bien en forma “spray-dried”, utilizada en procesos de compresión directa debido a su excelente fluidez y compresibilidad. Ambas existen con distintos tamaños de partícula. Si se utiliza para compresión directa posee la ventaja de su alta densidad y de que su compresibilidad no se ve afectada por los lubricantes. Es relativamente no higroscópica. Su contenido en agua es del 5%, pero es agua estructural al tratarse de la forma hidratada, y si esta agua se retira la lactosa pierde compresibilidad. La lactosa presenta muy pocas incompatibilidades y se puede usar con casi todos los tipos de principios activos, aunque se debe tener en cuenta que puede dar lugar a reacciones de Maillard cuando se emplea junto con compuestos que presentan grupos amino, produciéndose pardeamiento del comprimido (34). Esto no ocurre con tanta intensidad en la α -lactosa monohidrato en forma cristalina en comparación a la “spray-dried”.

Como modificación de la lactosa “spray-dried” surgió la lactosa FastFlo, que consiste en agregados de microcristales de α -lactosa monohidrato. Este tipo de lactosa presenta unas muy buenas características de compresibilidad y fluidez, que la hacen muy útil para compresión directa. A igualdad de fuerza de compresión con la lactosa FastFlo se obtienen durezas 3 o 4 veces superiores a las obtenidas con la lactosa “spray-dried”.

La lactosa también se puede presentar en forma anhidra. Se encuentra en forma cristalina y su capacidad de flujo viene marcada por su alto contenido en finos, por lo que se recomienda el uso de algún deslizante junto con ella. Posee una compresibilidad similar a la lactosa FastFlo y además se mantiene más estable en el tiempo conservada en recipiente hermético.

En condiciones de elevada humedad relativa la lactosa anhidra puede captar agua formando el compuesto hidratado provocando un incremento de su volumen. Por ejemplo, a una temperatura de 45° C con una humedad relativa del 70 % la lactosa anhidra puede incrementar hasta un 15 % de su volumen original. La lactosa anhidra posee excelentes propiedades de disolución, tan buenas o incluso mejores que la forma monohidratada.

5.1.e. Dextrosa

La dextrosa o D-(+)-glucosa es un monosacárido que se presenta en forma de polvo cristalino o granular blanquecino o sin color, sin olor y sabor dulce. Es ampliamente utilizado en tecnología farmacéutica como edulcorante (34), con un poder edulcorante de 0,74. Posee propiedades aglutinantes cuando se utiliza para procesos de granulación por vía húmeda y se emplea también como diluyente en la elaboración de comprimidos, tanto por granulación por vía húmeda como por compresión directa. Aunque sus propiedades como diluyentes son comparables a las de la lactosa, los comprimidos que contienen dextrosa requieren una mayor proporción de lubricante para su elaboración y presentan una menor friabilidad y una mayor dureza. Por sus propiedades ligeramente reductoras se utiliza en la elaboración de comprimidos de principios activos sensibles a la oxidación. Hay que tener en cuenta que puede dar lugar a pardeamiento del comprimido cuando se emplea junto a compuestos que presentan grupos amino por la reacción de Maillard (34).

5.1.f. Fructosa

La fructosa, también llamada levulosa o azúcar de la fruta, es un monosacárido que se presenta en forma de polvo cristalino blanquecino o sin color, sin olor y un intenso sabor dulce (34). Es considerado el azúcar natural más dulce, con un poder edulcorante de 1,7. Es higroscópica y absorbe cantidades significativas de agua en condiciones de humedad relativa superiores al 60%. Se utiliza en tecnología farmacéutica como saborizante y edulcorante.

Aunque resulta eficaz para enmascarar sabores desagradables, comprimidos con dureza y friabilidad adecuadas sólo se pueden obtener por compresión directa a bajas velocidades. Sin embargo, la mezcla de fructosa cristalina y sorbitol en proporciones 3:1 permite obtener comprimidos por compresión directa con propiedades adecuadas. La fructosa junto con una pequeña cantidad de almidón (Advantose FS 95) está comercializada como excipiente de compresión directa (34).

Al igual que la dextrosa y la lactosa puede dar lugar a pardeamiento en los comprimidos que contienen grupos amino por la reacción de Maillard (34).

5.2. Saborizantes

Los saborizantes, aquellos compuestos capaces de actuar sobre el sentido del gusto reforzando o modificando el sabor de otros, se pueden dividir en dos grupos: artificiales y naturales. La mayoría de los saborizantes son edulcorantes de alta intensidad que presentan la ventaja de no ser cariogénicos.

Los saborizantes artificiales, tales como sucralosa, aspartamo y sacarina, se han utilizado en combinación con azúcares tales como lactitol, maltitol y sorbitol para mejorar no sólo el sabor sino aumentar también la sensación agradable. Recientemente, los edulcorantes de origen vegetal como la stevia y la glicirricina han surgido

como una alternativa viable a los edulcorantes artificiales (22, 36). Por ejemplo, la glicirricina se extrae de la raíz de *Glycyrrhiza* y es 50-60 veces más dulce que la sacarosa, y la stevia (extracto vegetal de *Stevia rebaudina*), se ha

utilizado con éxito para enmascarar el sabor del ibuprofeno. En la Tabla 5 se detallan los edulcorantes más utilizados en tecnología farmacéutica.

Tabla 5. Principales edulcorantes utilizados en tecnología farmacéutica.

Tipo	Poder edulcorante	Origen	Termoestabilidad a temperaturas de secado	Estabilidad frente a cambios de pH
Sacarina	300	Síntesis	Termolábil	Estable
Aspartamo	160-200	Síntesis	Termolábil	Sensible
Neotame	10000	Síntesis	Termolábil	Sensible
Acesulfamo potásico	200	Síntesis	Termolábil	Estable
Ciclamato⁽¹⁾	30	Síntesis	Termoestable	Estable
Sucralosa	600	Semisíntesis	Termolábil	Estable
Neohesperidina dihidrocalcona	1500	Semisíntesis	Termolábil	Estable
Stevia	300	Natural	Termolábil	Sensible
Glicirricina	50	Natural	Termoestable	Sensible
Taumatín	2000	Natural	Termolábil	Estable

⁽¹⁾Prohibido por la FDA

A nivel de formulación los saborizantes generalmente se emplean en concentraciones que oscilan entre el 0,1 y el 3%. Se suelen añadir a la formulación en el paso previo a la adición del lubricante, ya que la mayoría se alteran si se ven sometidos a operaciones que suponen un aumento importante de temperatura como el secado tras una granulación húmeda. Antes de su incorporación se tamizan para evitar la formación de aglomerados y asegurar una óptima distribución del saborizante en la mezcla. En la mayoría de los casos resulta conveniente realizar una

premezcla con el resto de la fórmula o sólo con el diluyente para facilitar el mezclado. También se puede incorporar sobre los gránulos disuelto previamente en etanol.

En algunos casos, la incorporación de un saborizante puede neutralizar directamente el sabor amargo del principio activo en una formulación. Por ejemplo, se ha enmascarado el sabor de la lamivudina mediante el uso de una mezcla de limón, naranja y café. La Tabla 6 recoge ejemplos de la utilización de diferentes agentes saborizantes.

Tabla 6. Ejemplos de aplicaciones de diversos saborizantes en tecnología farmacéutica.

Saborizante (s)	Fármaco(s)	Porcentaje de saborizante(s)
Sucralosa y ácidos (ej. ácido cítrico)	Paracetamol, guaifenesina y hidrobromuro de dextrometorfano	50 a 300 mg de sucralosa en 100 ml de excipiente líquido base
Sucralosa	Aminoácidos (ej L-alanina y L-aspartico, a excepción de arginina), hidrolizados de proteínas y proteínas.	Sucralosa del 0.001 al 15% (p/p) del total
Sucralosa	Hemostáticos	Sucralosa del 0.01 al 15% (p/p) del total
Saborizantes artificiales (aspartamo, acesulfamo potásico, ciclamato, sacarina y sucralosa)	Levofloxacino	2.5 a 5g de levofloxacino 70-90% (p/v) de saborizantes por cada 100 ml de formulación
Mentol y edulcorantes (ej ácido glizirricico, sacarina, aspartamo o sucralosa)	Aspirina o paracetamol	Mezcla de 1 parte de mentol y 0.2-10 (p/p) parte de edulcorantes
Glicirricina y acesulfamo potásico	Minerales (potasio, calcio, magnesio, hierro, cromo, cobre y zinc)	0.0005-0.25% (p/v) de saborizante por 1% (p/v) de minerales

6. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS ESTRATEGIAS DE ENMASCARAMIENTO DEL SABOR

En la actualidad, la Real Farmacopea Española no define parámetros ni recoge ensayos de evaluación de la eficacia de los recursos empleados como enmascaradores del sabor desagradable. Ante este hecho surge la cuestión de con qué criterio se pueden comparar recursos de enmascaramiento entre sí, si no se dispone de procedimientos estandarizados de evaluación de los mismos. En un intento por subrayar la necesidad de estandarizar métodos de evaluación, en este apartado se describen las principales técnicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, desarrolladas hasta la fecha.

6.1. Técnicas de evaluación *in vivo*

6.1.a. Evaluación gustativo-sensorial en humanos (*Taste trials*)

Es el método más empleado en la actualidad. Este ensayo se realiza en individuos sanos que tras retener en la cavidad bucal durante un cierto tiempo la forma farmacéutica sólida oral en cuestión (4), deben evaluar su experiencia sensorial. Para evaluar perfiles temporales del enmascaramiento del sabor, se repite la operación anterior a distintos tiempos. En un intento por estandarizar la subjetividad a la hora de clasificar el sabor experimentado se emplean distintas escalas:

- Escalas numéricas, en las que el cero a menudo se asocia con ausencia total de percepción sensorial y el valor más alto de la escala con la máxima intensidad de sabor apreciable,
- Escalas de símbolos, representados generalmente por “-”, “+”, “++”, “+++”... Se asocia normalmente el símbolo “-” a la ausencia de percepción sensorial y el mayor número de “+” de la escala a la intensidad máxima.

- Escala visual analógica, consistente en una línea de 100 mm de longitud sobre la que el sujeto debe situar la sensación gustativa experimentada tomando como referencia el hecho de que un extremo se marque como la ausencia de sabor, y el opuesto como intensidad máxima de sabor.

- Escala descriptiva, denominada así puesto que a lo largo de la escala aparecen descriptores cualitativos de intensidad del sabor entre los cuales el sujeto debe situar su experiencia sensorial.

6.1.b. Test de preferencia en animales

Esta técnica *in vivo* evalúa la conducta animal ante distintos estímulos sensoriales gustativos, según muestren preferencia o aversión por determinados sabores (37). Los estudios realizados hasta la fecha han incluido ratas, ratones, gatos y perros (38).

6.1.c. Métodos electrofisiológicos

Estos métodos evalúan los perfiles de respuesta en términos de potenciales de acción desencadenados al poner a un animal anestesiado en contacto con la forma farmacéutica. Para ello, se precisa la implantación de electrodos a nivel de los nervios implicados en las aferencias gustativas. Tras la exposición al estímulo gustativo, se efectúa un lavado de la lengua para que las papilas recuperen las condiciones basales (38).

6.2. Técnicas de evaluación *in vitro*

6.2.a. Ensayos de disolución

El fármaco ha de estar disuelto en la saliva para desencadenar una respuesta sensorial a nivel de las papilas gustativas: éste es el fundamento sobre el que se asienta el empleo de los ensayos de disolución como técnica de evaluación de enmascaramiento de sabores desagradables.

De este modo, si durante el tiempo de residencia del medicamento en la cavidad bucal se consiguen mantener los niveles de fármaco disuelto por debajo de la concentración umbral necesaria para provocar el sabor desagradable en cuestión, se considera efectivo el recurso de enmascaramiento. Es un método indirecto, pues no contribuye a la evaluación del sabor *per se* del medicamento. Los ensayos de disolución han de llevarse a cabo en condiciones que simulen la cavidad bucal, pero además deben realizarse en al menos otras condiciones que garanticen la liberación y consiguiente absorción completa del fármaco en algún otro punto del tracto gastrointestinal, pues de lo contrario, aunque eficaz, el recurso de enmascaramiento alteraría las características biofarmacéuticas del preparado (38).

6.2.b. Activación *in vitro* de proteínas G

Los receptores sensoriales de las papilas gustativas se encuentran acoplados a proteínas G, que desencadenando una cascada de segundos mensajeros, conducen a la transducción de la señal química en señal nerviosa que posibilita en último término la percepción del sabor. De este modo, se puede evaluar la activación *in vitro* de las proteínas G asociadas mayoritariamente con estos receptores del sentido del gusto (transducina y gustducina) al contacto con un determinado estímulo (38,39).

6.2.c. Lenguas electrónicas (e-tongues)

Ante la necesidad de desarrollar sistemas automatizados de medida del sabor, surgen las lenguas electrónicas, sistemas para análisis de líquidos basados en una matriz de sensores de respuesta cruzada que reproducen de forma artificial el sabor al emular la vía aferente fisiológica de transducción (38). Este planteamiento hace necesario el tratamiento de datos para integrar las distintas señales y relacionarlas con su significado analítico. Así, las lenguas electrónicas están provistas de:

- muestreador automático, que inyecta secuencialmente las soluciones de calibración y lavado;
- matriz de sensores químicos de diferente selectividad, pues cada componente de la formulación interacciona con la membrana receptora generando una señal distinta, siendo la integración de éstas la que configura la respuesta del sensor;
- un transductor capaz de transformar la señal química en otro tipo de señal integrable por el software asociado;
- un sistema de procesamiento de la señal obtenida para el tratamiento de datos y obtención de resultados. Las lenguas electrónicas pueden clasificar sabores tanto cualitativa (obteniendo el patrón de algún sabor) como cuantitativamente (analizando algún compuesto determinado). Una forma de correlacionar ensayos *in vitro/in vivo* consiste en calibrar estos sistemas con los resultados de un *taste trial*.

Entre los sensores químicos utilizados en el diseño de matrices de lenguas electrónicas se encuentran principalmente sensores electroquímicos -entre ellos los potenciométricos (los más utilizados) y los voltamperométricos-, aunque alternativamente pueden emplearse sensores ópticos (provistos de una membrana con un indicador que altera sus propiedades ópticas en presencia de la muestra) o másicos (basados en el efecto piezoeléctrico) (38).

Entre las lenguas electrónicas comerciales, disponibles hoy en día, cabe destacar un modelo japonés desarrollado por Toko y formado por ocho sensores potenciométricos de una matriz polimérica con membranas lipídicas dispersadas en ella, que fue la primera lengua electrónica, y el modelo Astree® de AlphaMOS (Francia), de tipo potenciométrico con siete electrodos de distintas especificidades basados en el efecto de campo sensible a iones (40).

La Tabla 7 recoge la aptitud de cada técnica para la evaluación de los diferentes tipos de formas farmacéuticas sólidas orales recogidos en esta revisión.

7. CONCLUSIONES

El auge experimentado por formas farmacéuticas sólidas orales que persiguen una disgregación bien *ex vivo*, bien en la cavidad bucal ha vuelto a situar al enmascaramiento del sabor en primer plano como parámetro crítico en la formulación de medicamentos, ampliando su ámbito de aplicación más allá de las formas farmacéuticas líquidas orales. Este parámetro tiene relevancia no sólo a nivel comercial sino también a nivel clínico, pudiendo llegar a condicionar la adherencia a un tratamiento.

Este hecho adquiere una relevancia especialmente significativa en cierta población diana, principalmente geriátrica y pediátrica, donde la aceptación de un medicamento viene marcada en mayor medida por sus características organolépticas.

Justificada de este modo la relevancia del tema abordado, es necesario concluir que se deben destinar más recursos a la profundización tanto en las estrategias de enmascaramiento del sabor desagradable como en los excipientes empleados para tal fin y en la evaluación de otros nuevos que pudiesen incorporarse al arsenal terapéutico como coadyuvantes.

Asimismo, es más que notoria la falta de consenso en las técnicas de evaluación de la eficiencia de los recursos de enmascaramiento, a pesar de ser un procedimiento empleado desde hace décadas con formas farmacéuticas líquidas orales. Sin embargo, un análisis exhaustivo de las técnicas actualmente disponibles nos lleva a concluir que tal falta de armonización se puede deber en parte a que cada tipo de forma farmacéutica puede o no ser apta para una determinada técnica en función de su fundamento subyacente.

Tabla 7. Relación entre técnicas de evaluación del enmascaramiento de formas farmacéuticas sólidas orales, donde (+) apto, (-) no apto, (-/+) apto pero sin reproducir fielmente la forma de administración.

	Taste trial	Test de preferencia en animales	Modelos electrofisiológicos	Velocidad de disolución	Activación <i>in vitro</i> de proteínas G	Lengua electrónica
Convencional no recubierto	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Convencional recubierto	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Gastrorresistente	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Sublingual	(+)	(-)	(+)	(-)	(-/+)	(-/+)
Bucodispersable	(+)	(-/+)	(+)	(+)	(-/+)	(-/+)
Masticable	(+)	(-)	(-)	(+)	(-/+)	(-/+)
Soluble	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Efervescente	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Dispersable	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

8. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concesión de la ayuda para contratos predoctorales de Formación del Profesorado Universitario a Juan Aparicio Blanco (Referencia FPU13/02325).

9. REFERENCIAS

- Fu Y, Yang S, Jeong SH, Kimura S, Park K. Orally fast disintegrating tablets: developments, technologies, taste-masking and clinical studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2004; 21: 433-76.
- Parul BP. Fast Dissolving Drug Delivery Systems: An Update. *Pharmaceutical Reviews* 2006;4.
- Sohi H, Sultana Y, Khar RK. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 429-48.
- Gittings S, Turnbull N, Roberts CJ, Gershkovich P. Dissolution methodology for taste masked oral dosage forms. *J Control Release* 2014; 173: 32-42.
- Joshi S, Petereit HU. Film coatings for taste masking and moisture protection. *Int J Pharm* 2013; 457(2):395-406.
- Douroumis D. Orally disintegrating dosage forms and taste-masking Technologies 2010. *Expert Opin Drug Deliv* 2011; 8: 665-75.
- Shishu, Bhatti A, Singh T. Preparation of tablets rapidly disintegrating in saliva containing bitter taste-masked granules by compression method. *Indian J Pharm Sci* 2007;69:80-4.
- Bandari S, Mittapalli RK, Gannu R, Rao YM. Orodispersible tablets: An overview. *Asian J Pharm* 2008; 2:2-11.
- Shukla D, Chakraborty S, Singh S, Mishra B. Mouth Dissolving Tablets I: An Overview of Formulation Technology. *Sci Pharm* 2009; 77:309-326.
- Shukla D, Chakraborty S, Singh S, Mishra B. Mouth Dissolving Tablets II: An Overview of Evaluation Techniques. *Sci Pharm* 2009; 77:327-341.
- Yapar EA. Orally Disintegrating Tablets: An Overview. *J.App.Pharm.Sc* 2014; 4:118-125.
- Douroumis D. Practical approaches of taste masking technologies in oral solid forms. *Expert Opin Drug Deliv* 2007; 4: 417-426.
- Mennella JA, Beauchamp GK. Optimizing oral medications for children. *Clin Ther* 2008; 30:2120-32.
- Guyton C, Hall JE. The Chemical Senses – Taste and Smell Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Hong Kong: W.D. Saunders Company 2007.
- Mennella JA, Spector AC, Reed DR, Coldwell SE. The bad taste of medicines: overview of basic research on bitter taste. *Clin Ther* 2013; 35:1225-46.
- Mojet J, Christ-Hazelhof E, Heidema J. Taste perception with age: generic or specific losses in threshold sensitivity to the five basic tastes?. *Chem*

- Senses 2001; 26:845-60.
17. Coupland JN, Hayes JE. Physical approaches to masking bitter taste: lessons from food and pharmaceuticals. *Pharm Res* 2014;31:2921-39.
 18. Shi P, Zhang J. Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol Biol Evol* 2006; 23:292–300.
 19. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A et al. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 2010;35:157–70.
 20. Ley JP. Masking bitter taste by molecules. *Chem. Percept* 2008; 1:58–77.
 21. Mackles L, Chavkin L. Tasteless forms of basic drugs prepared by absorption in situ. United states patent U.S. 5811131. 1998.
 22. Patil V, Tambe V, Pathare B, Dhole S. Modern taste concealing techniques in pharmaceuticals: a review. *WJPPS* 2014, 3: 293-316
 23. Patell MH. Taste masking pharmaceutical agents. United States patent US 4916161. 1990.
 24. Mackles L, Chavkin L. Aerosol foam with adsorbate and container containing same United States patent US 4,889,709. 1989.
 25. Eichmann ML. Drug resin complexes stabilized by chelating agents. United States patent U.S. 5980882. 1999.
 26. Appelgren C, Eskilson C. A novel method for the granulation and coating of Pharmacologically active substances. *Drug Dev Ind Pharm* 1990; 16: 2345-51.
 27. Xu J, Bovet LL, Zhao K. Taste masking microspheres for orally disintegrating tablets. *Int J Pharm* 2008; 359: 63-9.
 28. Bruschia ML, Cardoso MLC, Lucchesi MB, Gremiao MPD. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterisation. *Int J Pharm* 2003; 264: 45–55.
 29. Kajiyama A, Tamura T, Mizumoto T, Kawai H, Takahashi T. Quick disintegrating tablet in buccal cavity and manufacturing method thereof. United States patents US 6656492. 2003.
 30. Hashimoto Y, Tanaka M, Kishimoto H. Preparation, characterisation and taste-masking properties of polyvinylacetal diethylaminoacetate microspheres containing trimebutine. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1323-8.
 31. Patel AR, Vavia PR. Preparation and evaluation of taste masked famotidine formulation using drug/beta-cyclodextrin/polymer ternary complexation approach. *AAPS PharmSciTech* 2008;9: 544-50.
 32. Arima H, Higashi T, Motoyama K. Improvement of the bitter taste of drugs by complexation with cyclodextrins: applications, evaluations and mechanisms. *Ther Deliv* 2012;3: 633-44.
 33. Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins II: In vivo drug delivery. *J Pharm Sci* 1996, 85:1142–69.
 34. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. United Kingdom and United States of America: Pharmaceutical Press 2009.
 35. Kuno Y, Kojima M, Ando S, Nakagimi H. Evaluation of rapidly disintegrating tablets by phase transition of sugar alcohols. *J Control Release* 2005;105:16-22.
 36. Chase GD, Gennaro AR, Gibson MR. Pharmaceutical Necessities. In Remington's Pharmaceutical sciences. 16th ed. Pennsylvania: Mack publishing company; 1980.
 37. Tordoff MG, Bachmanov AA. Mouse taste preference tests: why only two bottles? *Chem Senses* 2003; 28: 315–24.
 38. Anand V, Kataria M, Kukkar V, Saharan V, Choudhury PK. The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals. *Drug Discov Today* 2007;12: 257-65.
 39. Ming D, Ruiz-Avila L, Margolskee RF. Characterization and solubilization of bitter-responsive receptors that couple to gustducin. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998; 95: 8933–38.
 40. Mifsud JC, Lucas Q. Alpha M.O.S. Apparatus and method for characterizing liquids. United States patent US 6290838. 2003.



Reactive oxygen species and vascular remodeling in cardiovascular diseases

Title in Spanish: *Especies reactivas de oxígeno y remodelado vascular en enfermedades cardiovasculares*

Andrea Aguado¹, M. Soledad Avendaño¹, Ana M. Briones¹, Mercedes Salaiques^{1*}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), 28029, Madrid, Spain

ABSTRACT: Reactive oxygen species (ROS) are reactive derivatives of O₂ metabolism produced by all types of vascular cells. ROS play an important role in both physiological and pathological situations by acting as intracellular signaling molecules which regulate vascular function and structure. Accordingly, oxidative stress is implicated among other processes in inflammation, hypertrophy, migration, growth/apoptosis and extracellular matrix protein turnover which are important processes involved in vascular remodeling in cardiovascular diseases. In the cardiovascular system, the major source of ROS is the NADPH oxidase family of enzymes composed by seven members where NOX-1 and NOX-4 are the main isoforms in vascular smooth muscle cells. This review highlights the importance of NOX-derived ROS in vascular biology and focuses on the potential role of oxidative stress in vascular remodeling.

RESUMEN: Las especies reactivas de oxígeno son derivados reactivos del metabolismo del O₂ producido por todos los tipos celulares a nivel vascular. Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en situaciones tanto fisiológicas como patológicas mediante su actuación como moléculas de señalización intracelular que regulan la función y estructura vascular. De esta manera, el estrés oxidativo está implicado, entre otros procesos, en la inflamación, hipertrofia, migración, proliferación/apoptosis y reciclaje de proteínas de matriz extracelular, los cuales son procesos importantes implicados en el remodelado vascular durante enfermedades cardiovasculares. En el sistema cardiovascular, la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno es la familia de enzimas NADPH oxidase formadas por siete miembros donde NOX-1 y NOX-4 son las principales isoformas en células musculares lisas vasculares. Esta revisión destaca la importancia de las especies reactivas de oxígeno derivadas de NOX en la biología vascular y se centra en el papel potencial del estrés oxidativo en el remodelado vascular.

*Corresponding Author: mercedes.salaiques@uam.es

Received: May 21, 2015 Accepted: July 5, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 2 (2015), pp.129-144

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the first cause of death globally, accounting for more than 30% of deaths which means that 17.5 million people die annually from cardiovascular disease. In Spain, the number of deaths due to cardiovascular diseases in 2014 was over 129,000 people and this number will increase in 2020 reaching 142,000 deaths. According to the "Centro de Estudios Económicos y Empresariales" the direct costs of cardiovascular diseases have been estimated over 5.900 million of euros in 2014 and the indirect costs due to morbidity associated with cardiovascular disease as well as absence from work have been estimated over 60 million euros.

Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators of cell physiology. They can modulate the activity of many signaling molecules including kinases, phosphatases,

transcription factors and cytoskeleton proteins and thus, they regulate different cellular processes. ROS play an important physiological role in controlling vascular tone and structure and they can also contribute to pathological mechanisms related to endothelial dysfunction, vascular reactivity, arterial remodeling and vascular inflammation. The NADPH oxidases are the main source of ROS in the cardiovascular system. Seven members have been characterized and depending on the isoform, they are expressed in different cardiovascular cell types and cellular compartments regulating diverse functions such as proliferation, migration, differentiation, apoptosis, senescence and inflammatory responses (1-3). For several decades, the role of NADPH oxidase in chronic granulomatous disease has been known due to the key role of NADPH oxidase in neutrophils. This concept has been now extended to cardiovascular diseases since strong evidences have demonstrated that NADPH oxidase-

derived ROS released from phagocytic and vascular cells are involved in many processes associated to cardiovascular disease. Thus, many studies performed mainly in animal models have demonstrated that increased oxidative stress state is necessary for the initiation and progression of vascular disease that may ultimately lead to heart attack and strokes. Some members of the NADPH oxidases are constitutively expressed in the vasculature. However, different hormones, inflammatory mediators or hemodynamic stimuli important in cardiovascular diseases, increase the activity or the expression of NADPH oxidase isoforms leading to a deleterious oxidative stress status in the cardiovascular system. These changes trigger the production of growth factors, proteases and cellular adhesion molecules by different vessel cell types leading to structural changes in the wall of the vessel in a process known as vascular remodeling.

In this review, we discuss in detail the composition and regulation of the main NOX enzymes expressed in the media layer (NOX-1 and 4) and their roles in vascular remodeling associated with cardiovascular diseases.

2. VASCULAR REMODELING

2.1. Artery structure

Arteries are divided in three concentric layers from the inside out: intima, media and adventitia which are organized in cellular components and extracellular matrix (ECM) (Figure 1).

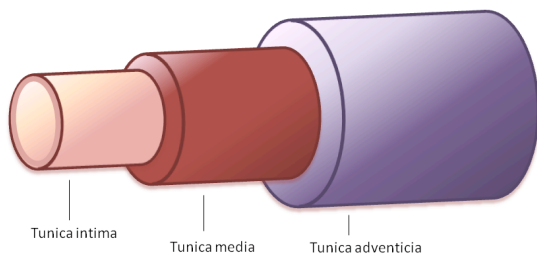


Figure 1. Artery structure. Wall section showing all layers of an artery wall.

- Intima: it is in the inner part of the vessel and comprises a monolayer of endothelial cells which lay in the basement membrane. This layer of endothelial cells is separated from the media layer by the internal elastic lamina which is a fenestrated lamina of elastic fibers. The intima layer is important in the control of vascular function and structure because endothelial cells are an important source of vasoconstrictor/vasodilator and proliferative/antiproliferative factors.

- Media: this layer includes circumferentially arranged vascular smooth muscle cells (VSMCs) and variable

amounts of ECM. The tunica media is separated from the tunica adventitia by a second layer of elastic fibers, the external elastic lamina. In response to different vasoactive factors and hemodynamic forces, VSMCs can release a variety of substances which affect vascular tone and structure.

- Adventitia: it is mainly formed by fibroblasts but it also contains macrophages and mast cells and different components of the ECM. In the last years, it has become evident that the adventitia is not only a mechanical support for the vessel but also an active player of the regulation of vascular tone and structure by releasing different factors.

The ECM is a gel-like form which functions as a scaffolding structure for the vascular cells and determines the elasticity and mechanical properties of the vessels. Their components are synthesized by different cell types of the vascular wall. The two main ECM proteins are collagen and elastin; while elastin confers the elastic properties to vessels, collagen provides the strength (4). There are other ECM proteins that are in less quantity such as glycoproteins, proteoglycans and integrins that are involved in several cellular processes (4). Among them, tenascin-C (TN-C), which is an inducible glycoprotein, expressed predominantly in embryonic, remodeled adult tissues and in pathological conditions, is particularly interesting. Competitive binding of TN-C to ECM proteins and their counterpart cell-surface receptors mediates its ability to modulate cell-ECM interactions. The capacity of TN-C to interact with a wide range of ECM molecules may also enable it to contribute to the structural organization of the ECM. In addition, TN-C can promote migration and proliferation by direct activation of cell-surface growth factor receptors and cellular differentiation by up-regulating androgen receptor and endothelin type 1 receptor expression (5). Thus, TN-C relevance relies on its implication in vascular cell differentiation, proliferation and migration (5).

2.2. Types of vascular remodeling

It is now accepted that the vascular wall can change its structure in order to maintain the appropriate lumen size to permit normal blood flow. This process is termed vascular remodeling (6). This ability of the arteries to adapt its structure in response to physiological and pathological conditions is essential in situations such as pregnancy or aging but also in many arterial diseases. Thus, the inability of the vessels to remodel appropriately is considered a form of “vascular failure” that can lead to pathologic states such as hypertension, atherosclerosis or restenosis (7). This process is active and involves structural changes including cell growth, death, migration and the synthesis or degradation of the ECM (7).

Vascular remodeling can occur with or without growth of the vessel wall (i.e. hypertrophic, eutrophic or hypotrophic) and with smaller, greater or similar lumen size (inward, outward or compensated) (8). Vascular remodeling often differs depending on the vessel type or the cardiovascular disease model (Figure 2).

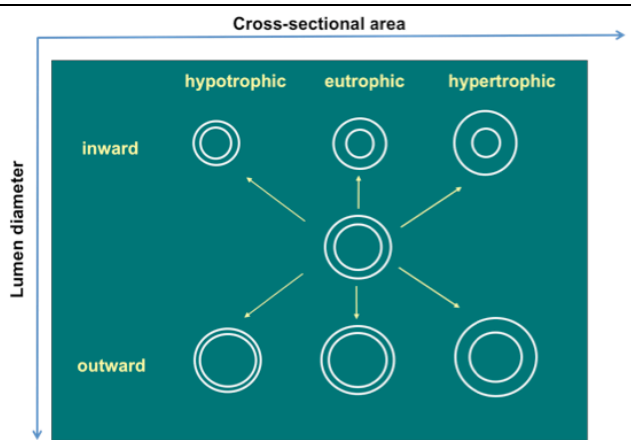


Figure 2. Types of vascular remodeling. Classification refers to changes on the lumen diameter (inward: upper row or outward lower row) and vessel cross-sectional area (hypotrophic: left column; eutrophic: center column and hypertrophic: right column). Adapted from Mulvany (8).

- **Hypertrophic remodeling** is characterized by an increase in the media thickness, media/lumen and vascular cross sectional area associated with a more evident contribution of cell growth (8). This type of remodeling is characteristic of large arteries in ageing or in pathologies like hypertension (9) or restenosis which is associated with proliferation and migration of different cells types (7).

- **Hypotrophic remodeling** is associated with a decrease in the amount of material (i.e. diminished cross sectional area) around the vessel wall (8). This type of remodeling may be related to apoptosis processes and/or to rearrangement of the material in the vessel wall (10). Hypotrophic remodeling has been shown in renal afferent arterioles from spontaneously hypertensive rats (SHR) (11) and in mesenteric resistance arteries from ouabain-induced hypertensive animals (12). Moreover, patients with autosomal dominant hyperimmunoglobulin E syndrome were found to have a high prevalence of hypotrophic remodeling in carotid arteries with an increased circumferential stress and enhanced susceptibility to dilation and aneurysm formation associated to angiotensin II (AngII) and apolipoprotein E (13).

- **Eutrophic remodeling** is characterized by a decrease in the outer and lumen diameters and an increase in the media thickness and the media/lumen ratio with no change in the wall cross sectional area (8). It has been suggested that this type of remodeling is due to rearrangement of the same amount of wall material around a smaller vessel

lumen (14, 15). The mechanisms leading to this type of remodeling are poorly known but some authors suggest that a combination of inward growth and peripheral apoptosis or prolonged vasoconstriction of vascular cells embedded in an expanded ECM can lead to eutrophic remodeling (9, 16).

The importance of the vascular structural abnormalities in cardiovascular diseases, such as hypertension, lies on the fact that in patients it has been demonstrated that the media to lumen ratio parameter has a prognostic value of cardiovascular events in a high-risk population (17, 18). Thus, the presence of structural alterations in the microcirculation may be considered an important link between hypertension and ischemic heart disease, heart failure, cerebral ischemic attacks, and renal failure (15).

Vascular tone and structure are regulated by the equilibrium between vasodilator- antiproliferative- antifibrotic factors and vasoconstrictor- proliferative- profibrotic factors, which are released in large part, by the ECs and VSMCs in response to mechanical or chemical stimuli. The imbalance between these substances leads to the endothelial dysfunction and/or the vascular remodeling observed in cardiovascular diseases. Vascular remodeling can be induced by dynamic interactions between local growth factors, vasoactive substances and hemodynamic stimuli being all important mediators in the vascular adaptation process. The number of mediators involved in altered vascular structure is continuously growing; however, to date it is well admitted that AngII, cytokines, prostanoids and ROS have a key role (7).

2.3. Cell proliferation and migration

As mentioned, wall thickening is one of the main features of many cardiovascular diseases. Depending on the specific vascular bed and pathology, the cellular and non-cellular events leading to altered vascular structure might be different. Thus, hypertension causes arterial media thickening with or without cell growth, and ECM deposition in both humans and animal experimental models; however, atherosclerosis and reaction to injury such as endothelial denudation or restenosis cause intimal thickening associated to variable degrees of alterations in the surrounding ECM (19, 20) (Figure 3). Although it is known that during vascular remodeling VSMC proliferation and migration are processes that take place, their regulation is not exactly known.

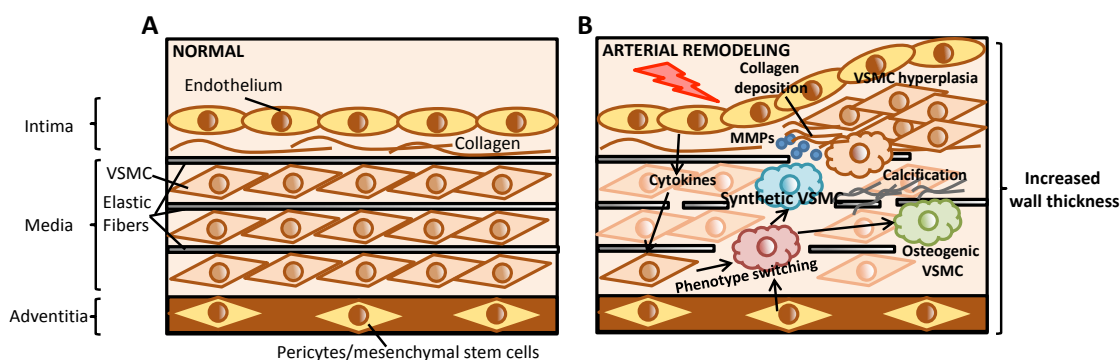


Figure 3. Pathophysiological mechanisms of arterial remodeling. Cross sectional schematic view of the arterial wall in (A) normal situation or (B) during arterial remodeling. Thickening of the wall is the main feature of arterial remodeling. Elastic fiber degradation, extracellular matrix calcification, collagen deposition and vascular smooth muscle cell migration and phenotype switching lead to adaptation of the vascular wall. Matrix metalloproteinase (MMP). Modified from van Varik et al. (20).

Intimal thickening can occur in blood vessels as a consequence of physiological process as occurs in ageing, in response to increased intraluminal pressure, or after vascular injury as observed in balloon dilatation, stent implantation or atherosclerosis processes (21). Because of its importance, many *in vivo* models of VSMC growth and proliferation such as the carotid ligation mouse model have been developed. In this model, an intima lesion characterized by enrichment of VSMCs occurs in response to luminal narrowing leading to the formation of the neointima (19, 21). Neointima is part of the reparative response to injury and its formation involves an important inflammatory component with infiltration of inflammatory cells and release of cytokines and chemokines, thrombosis, increase in the number of VSMCs and matrix production leading to a reduction in vessel diameter (19, 22, 23). The increased number of VSMCs is mainly originated by migration from the underlying media and proliferation, although there are other processes involved such as transdifferentiation of endothelial cells or differentiation from circulating precursors (7, 20, 21) (Figure 3).

The involvement of cell proliferation and/or migration in hypertensive vascular remodeling mainly depends of the vascular bed and the experimental model studied. Thus, coronary but not mesenteric vessels from SHR show

increased VSMC number (24). In addition, administration of AngII, the main effector peptide of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) lead to a progressive increase in blood pressure and media thickening through migration, proliferation and hypertrophy of the VSMCs, being this effect mediated through the AngII type 1 receptor (AT₁R) (7, 25-28) (Figure 4). Besides hemodynamic and humoral factors, in the last years it has become evident that vascular infiltration of immune inflammatory cells and pro-inflammatory mediators such as ROS are key contributors to the vascular remodeling observed in this pathology (29-31).

Cell proliferation and migration begin with stimulation of cell surface receptors that transduce the external signal to a series of coordinated responses inside the cell. Diverse signal transduction systems such as nuclear factor-kappa B (NF- κ B), the activator protein-1 (AP-1), the mitogen activated protein kinases (MAPKs) or the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathways have been proposed to translate the stimulus within VSMCs (32). However, despite of the growing information regarding the mechanisms controlling VSMC migration and proliferation in response to stimuli such as AngII (28), the regulation in response to other stimuli is less known.

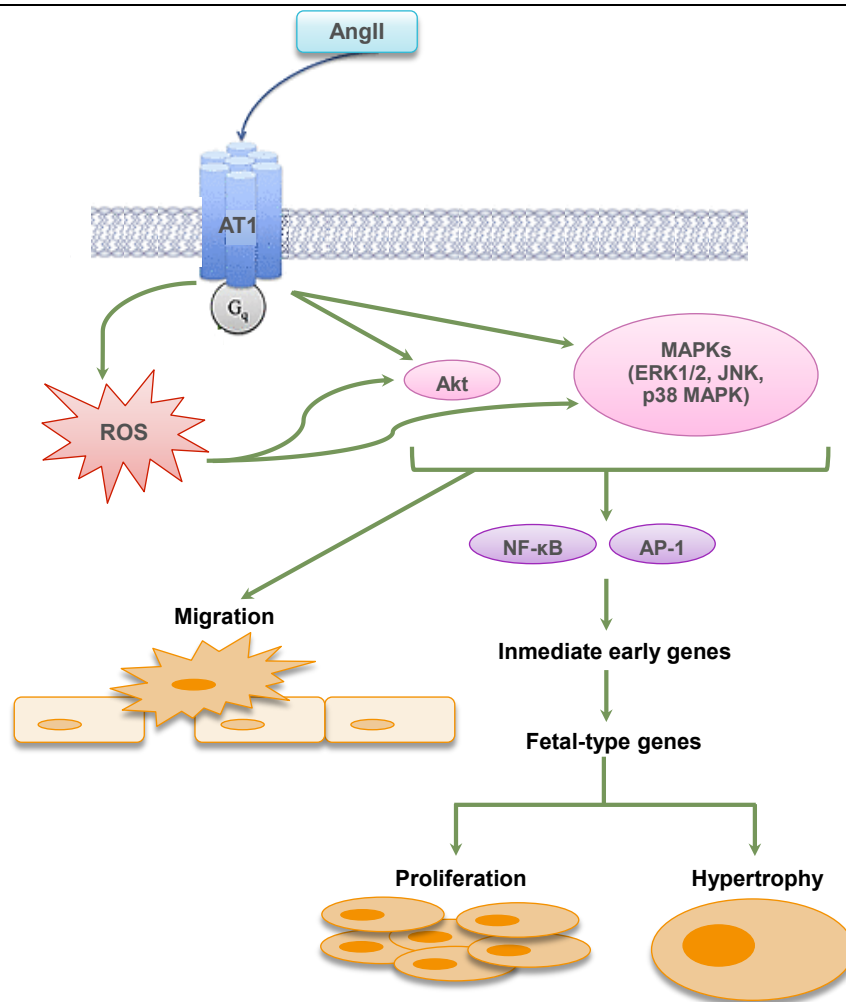


Figure 4. Role of ROS in AngII induces proliferation, migration and/or hypertrophy of VSMCs. Arrows indicate the main biological end points preceding cell proliferation, migration and hypertrophy in response to AngII. Adapted from Chiou et al. (28).

3. REACTIVE OXYGEN SPECIES

ROS are reactive derivatives of the oxygen metabolism with superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) being of major importance. There is an apparent paradox between the roles of ROS as essential biomolecules in the regulation of many cellular functions and as toxic by-products of metabolism that may be related at least in part, to differences in the concentrations of ROS produced. Thus, at low intracellular concentrations, ROS have a key role in the physiological regulation of vascular tone, cell growth, adhesion, differentiation, senescence and apoptosis. However, excessive ROS levels may be associated with the development of several cardiovascular diseases (33, 34).

$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and $ONOO^{\cdot}$ are produced by almost all cell types including vascular cells. Besides NADPH oxidase, other sources of ROS in the vascular wall include mitochondria, xanthine oxidase (XO), uncoupled endothelial nitric oxide synthase (eNOS), endoplasmic reticulum, cyclooxygenase (COX), cytochrome P450 and lipoxygenase (35, 36). Mitochondria are a major cellular source of ROS. There are several sites in the electron-

transport chain where oxygen can be reduced to $O_2^{\cdot-}$, with complexes I and III being the sites with the greatest capacity (37). XO catalyzes the sequential oxidation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to urate and can generate $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 (38). XO is mainly expressed in the endothelium and both its protein expression and $O_2^{\cdot-}$ production can be activated by AngII (39). eNOS uses L-arginine as substrate and tetrahydrobiopterin (BH_4) as cofactor to generate NO. However, under pathological conditions, L-arginine or BH_4 deficiency induces eNOS uncoupling resulting in $O_2^{\cdot-}$ production (40).

$O_2^{\cdot-}$ is highly reactive, has a short half-life and is unable to diffuse across biological membranes except possibly via ion channels (33). $O_2^{\cdot-}$ can dismute to H_2O_2 , both spontaneously and enzymatically via any of the three isoforms of the superoxide dismutase (SOD): cytosolic Cu/Zn-SOD or SOD1, mitochondrial Mn-SOD or SOD2 and extracellular EC-SOD or SOD3 (Figure 5). As mentioned, H_2O_2 can also be formed directly by some types of NOX such as NOX-4, DUOX-1 and -2 (1). H_2O_2 is more stable than $O_2^{\cdot-}$ and crosses membranes through some members of the aquaporin family (41). H_2O_2 is

rapidly metabolized to water and oxygen by several enzymatic systems such as glutathione peroxidase, catalase and the thioredoxin system (35, 42, 43) (Figure 5). In the presence of transition metals (such as Fe^{2+}) H_2O_2 can be converted to hydroxyl radicals (HO^\bullet), which are highly reactive and can cause damage to lipids, proteins and DNA. In addition, NO which has a very short half-life, can react with $\text{O}_2^{\bullet-}$ to form ONOO^- that is capable of modifying the structure and function of proteins. Thus, ROS regulation is important to maintain redox environment of the cell. When there is an imbalance between oxidants and antioxidant systems increased ROS steady-state levels start multiple pathologies including inflammation and cardiovascular disease (1, 35). At low intracellular concentrations, ROS have a key role in the physiological regulation of vascular tone, cell growth, adhesion, differentiation, senescence and apoptosis (1, 44).

However, an increase in the amount of ROS leads to pathological processes such as endothelial dysfunction, inflammation and proliferation or migration of VSMCs leading to vascular remodeling.

The mechanisms responsible of ROS-associated pathological effects are multiple and include quenching of vasodilator NO by $\text{O}_2^{\bullet-}$, generation of vasoconstrictor lipid peroxidation products, depletion of BH_4 , and induction of fibrosis through activation of matrix metalloproteinases (45). At intracellular level, ROS induce different processes such as increased intracellular calcium, activation of growth and inflammatory transcription factors and activation of different signaling pathways such as mitogen activated protein kinases (MAPK), protein tyrosine phosphatases, tyrosine kinase, PI3K, and RhoA/ROCK (34).

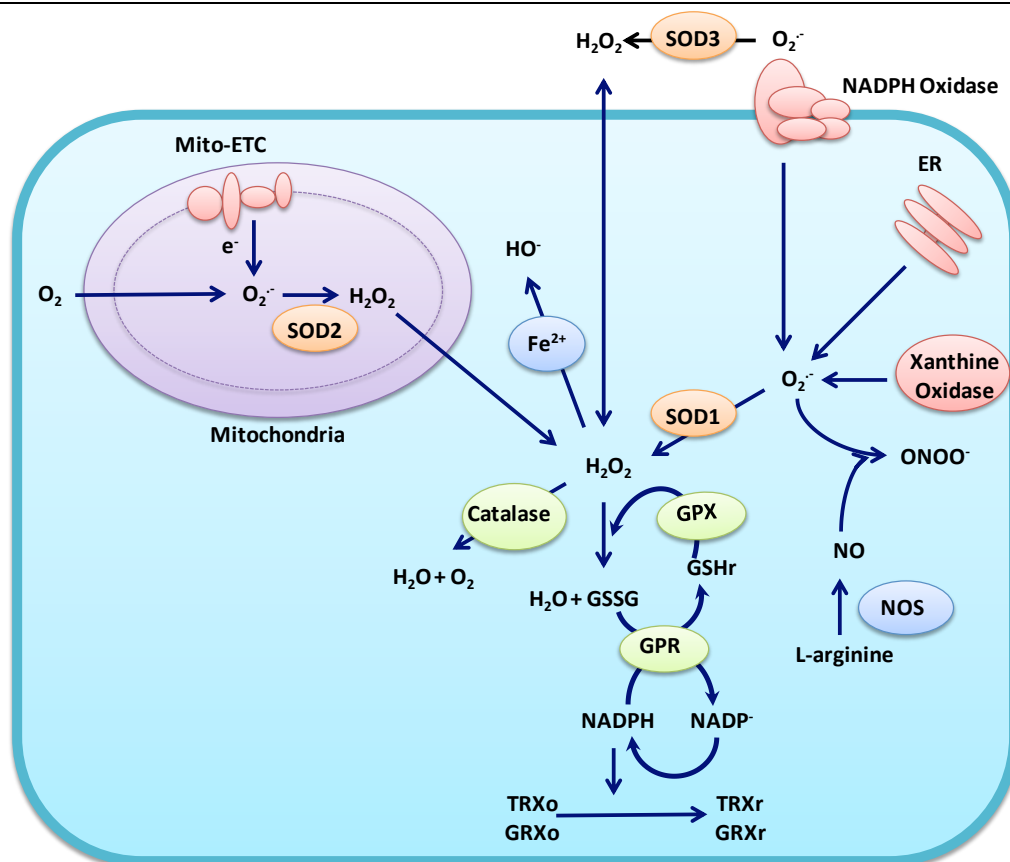


Figure 5. Reactive oxygen species formation and metabolism. Major sources of ROS generation include the mitochondrial electron transport chain (Mito-ETC), endoplasmic reticulum (ER) system, NADPH oxidase and xanthine oxidase. Superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) is the main initial free radical species which can be converted to other reactive species. In the mitochondria, $\text{O}_2^{\bullet-}$ is generated by the capture of electrons escaping from the Mito-ETC by molecular oxygen (O_2). $\text{O}_2^{\bullet-}$ can be rapidly converted to hydrogen peroxide (H_2O_2) by superoxide dismutase (SOD), which is converted to H_2O by catalase, glutathione peroxidase (GPX) or the thioredoxin (TRX) systems. In the presence of transition metals (such as Fe^{2+}), H_2O_2 can be converted to hydroxyl radicals (HO^\bullet). NO has a very short half-life and can react with superoxide to form ONOO^- . Glutathione reductase (GPR); glutaredoxin oxidized (GRXo); glutaredoxin reduced (GRXr); glutathione reduced (GSHr); glutathione oxidized (GSSG); thioredoxin oxidized (TRXo); thioredoxin reduced (TRXr). Adapted from Trachootham et al. (43).

ROS can act as second messengers activating different intracellular signaling pathways. Particularly, H_2O_2 induces post-translational oxidative modifications on sulfur containing amino acid of proteins. Although

methionine and cysteine residues can be targets, the most important is the cysteine thiol group. ROS react with the sulfur atom of cysteine side chains leading to the formation of sulfenic acids ($-\text{SOH}$) that can affect proteins

implicated in cell migration. Depending on the environmental oxidative state these reactions are reversible or irreversible. Thus, in a reducing environment in the cell (normal status) this process is quickly reverted. Conversely, in a strongly oxidative environment, the sulfenic form is unstable and can undergo further oxidation via disproportionation (a type of redox reaction where a species is simultaneously reduced and oxidized to form two different products) to sulfinic (-SOH₂) species. Under greater oxidative stress, the sulphonic (-SO₃H) species can be created. Other possibilities for post-translational cysteine modifications include glutathionylation (-SSG) or the formation of an inter- or intramolecular disulfide bond (-SS-), thus causing protein oxidative damage (45-47).

It is also well established, that redox-dependent signaling pathways in VSMCs include modifications in the activity of protein tyrosine kinases such as Src, Ras, JAK2, Pyk2,

PI3K and EGFR, as well as MAPK, particularly p38 MAPK, ERK1/2 and ERK5 which as mentioned, have a key role in cell migration and proliferation and hence in pathological vascular remodeling (45). These processes probably occur through oxidation/reduction of protein tyrosine phosphatases (PTP), which are susceptible to oxidation and inactivation by ROS. Increased intracellular ROS also induces an increase in intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and an increase in intracellular pH (pH_i) that also contribute to altered contraction and remodeling observed in pathological situations where ROS have a prominent role (45). Rho GTPases and actin are also sensitive to these modifications leading to actin cytoskeleton reorganization (45, 47, 48). Thus, ROS are able to induce VSMC proliferation and migration by a number of different intracellular signaling pathways (Figure 6).

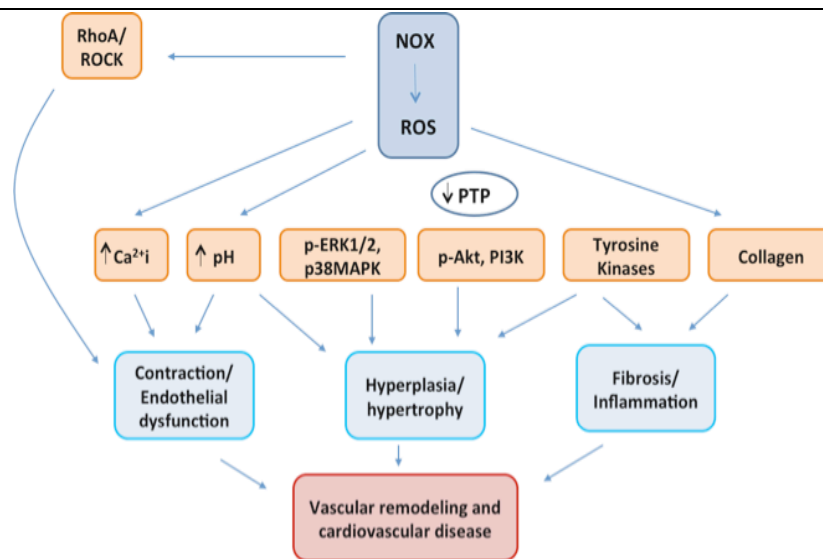


Figure 6. Intracellular mechanisms activated by ROS that participate in cardiovascular disease. NOX-derived ROS activate different signaling pathways as well as increase in pH and Ca²⁺. These processes lead to different cellular responses that will end in cardiovascular disease. Adapted from Briones and Touyz (45).

To date, a number of studies have demonstrated that stimuli important for cardiovascular diseases induce VSMC migration and/or proliferation *via* ROS (49). For example, AngII regulates FAT atypical cadherin 1 (Fat1) expression and activity and induces Fat1-dependent VSMC migration via activation of AT₁R, ERK1/2, and NOX-1-derived ROS (50). Similarly, PDGF-induced VSMC migration is ROS dependent and the Src/PDK1/PAK1 signaling pathway is important as a ROS-sensitive mediator of migration (51). Moreover, in VSMCs H₂O₂ induces cell migration by inducing the expression of a cytoskeleton protein, ARPC2, through a p38 MAPK-dependent mechanism (41)

3.1. NADPH oxidases

As mentioned, NADPH oxidases are the major source of ROS in the vascular wall in physiological and pathological conditions (1, 34, 52-54). The main catalytic function of NADPH oxidases is the generation of ROS,

thus differing from the rest of the ROS-producing enzymes which produce ROS as a by-product of their activity. NADPH oxidase reduces oxygen to superoxide anion (O₂⁻), being NADPH the electron donor; thus, there is an electron transfer from the cytosol across biological membranes. There are seven NADPH oxidases isoforms in mammals and all of them have a catalytic subunit called NOX (NOX-1-5) or DUOX (DUOX-1-2 also called NOX-6-7) and up to seven regulatory subunits (Figure 7).

NOX-1, NOX-2, NOX-4 and NOX-5 are expressed in the cardiovascular system. NOX-2 is the classical NOX that was primarily characterized in leukocytes. NOX-1, NOX-2 and NOX-3 activities are regulated by cytosolic adaptor proteins or “NOX organizers” (p47phox or NOXO1 and p40phox) and “NOX activators” (p67phox or NOXA1) that bind GTP-Rac and affect the flow of electrons (Figure 7). The p22phox component forms a stable heterodimeric complex with NOX core components (NOX-1-4), required for post-translation processing or

maturation into active oxidases. In NOX-1/NOX-3 systems, p22phox also promotes plasma membrane targeting of the oxidases and provides a docking site for NOX organizers. However, NOX-4 only depends on p22phox in order to be active, is constitutively activated,

and ROS production is regulated by Poldip2 (Figure 7). NOX-5 and DUOX are Ca²⁺-responsive oxidases that contain Ca²⁺-binding domain (Figure 7). NOX-1, NOX-2, NOX-3 and NOX-5 produce O₂^{•-} while NOX-4, DUOX-1 and DUOX-2 produce H₂O₂ (34, 55).

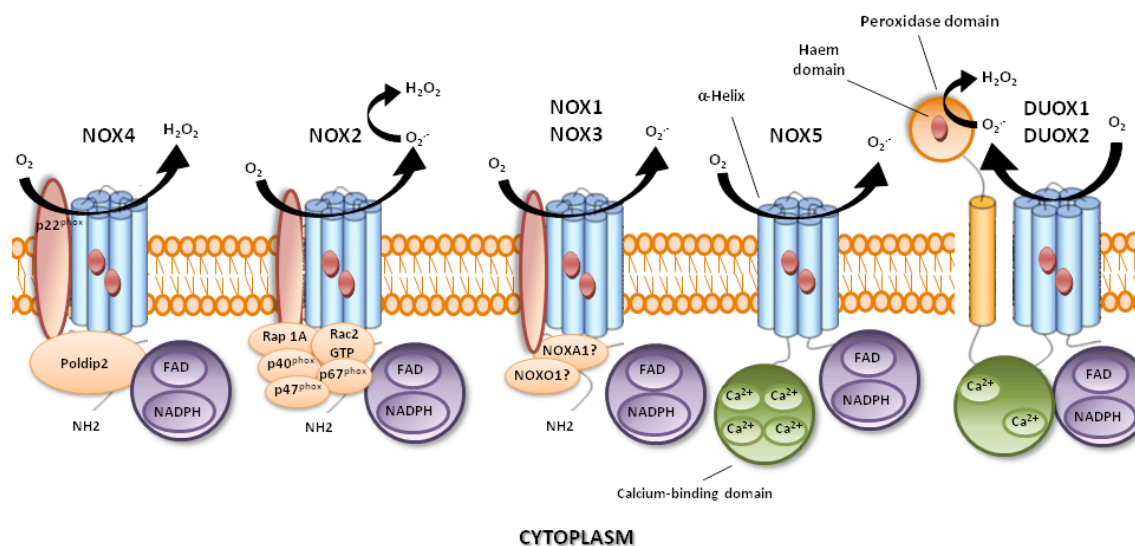


Figure 7. Subunit composition of the seven mammalian NADPH oxidase isoforms. The catalytic subunits of NADPH oxidase (NOX) 1-5, dual oxidase (DUOX) 1 and 2 are shown in blue. The stabilization subunit p22phox is shown in red. Cytosolic organizers: p40phox, NOX organizer 1 (NOXO1) and p47phox; cytosolic activators: p67phox and NOX activator 1 (NOXA1); and small GTPases (RAC1 and RAC2), are shown in grey. Polymerase δ -interacting protein 2 (POLDIP2) and calcium-binding domains motifs are shown in orange or green respectively. Adapted from Montezano and Touyz (34) and Guichard et al. (55).

Within the vascular wall, NOX isoforms locations vary depending on the cell type and the cellular compartments. Thus, endothelial cells express NOX-1, NOX-2, NOX-4 and NOX-5; VSMCs mainly express NOX-1, NOX-4 and NOX-5; and adventitial fibroblasts mainly express NOX-2 and NOX-4 (1). It is noteworthy that NOX-5 is only expressed in human cells (1). NOX distribution in subcellular compartments also varies within the cell. In VSMCs, NOX-1 is localized to the plasma membrane, caveolae and endosomes while NOX-4 seems to be in focal adhesions, endoplasmic reticulum and nucleus (1, 56). Additionally, NOX-4 seems to be present in the mitochondria of cardiomyocytes (56).

Because of their preferential expression in VSMCs and their importance in vascular remodeling, in the next part of the Review we will focus on specific aspects of NOX-1 and NOX-4 including available information on regulation, function and their role in vascular remodeling.

3.1.a. NOX-1

NOX-1 is expressed in colon epithelium and also in other tissues including the vascular wall where it seems to be up-regulated in pathological conditions or after exposure to different agonists important in cardiovascular disease (54). Thus, in VSMCs NOX-1 is up-regulated by AngII (57, 58), PGF_{2 α} and PDGF (59), IFN- γ (60) or IL-1 β (61). In addition, vascular NOX-1 expression is elevated in several *in vivo* animal models of hypertension such as two-kidney two-clip renovascular hypertensive rats, DOCA salt hypertensive rats and AngII-infused mice (62-64). Moreover, NOX-1 expression is elevated during restenosis following balloon angioplasty (65). However, the role of NOX-1 in atherogenesis remains controversial with NOX-1 being undetected in atherosclerotic rabbit (66) or human lesions (67, 68) and overexpressed in aorta from ApoE^{-/-} mice (69).

NOX-1 promoter has different binding sites for transcription factors including a member of CREB/ATF

family (59), AP-1 (70), NF- κ B (71) or Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) (60) (Figure 8).

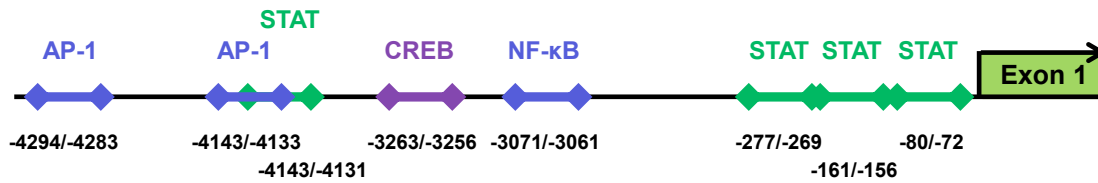


Figure 8. Structure of human NOX-1 gene promoter. Binding sites for transcription factors involved in NOX-1 expression.

Most of these studies have evaluated transcriptional regulation of NOX-1. However, to our knowledge, no studies have demonstrated post-transcriptional regulation of NOX-1. In fact, regulation of NOX-1 mRNA through its 3'UTR is conceivable because of the presence of AREs which are implicated in mammalian mRNA degradation. Accordingly, our group has described in VSMCs a new mechanism whereby in the presence of AngII plus IL-1 β , NOX-1 expression is potentiated through HuR-dependent NOX-1 mRNA stabilization. Moreover, exacerbated NOX-1 expression is responsible for an increased NADPH oxidase activity, ROS production and cell migration (72).

3.1.b. NOX-4

NOX-4 is very abundant in kidney and it seems ubiquitously expressed mainly in differentiated cells. NOX-4 is mostly found in focal adhesions and in the endoplasmic reticulum (73-75). As mentioned, its structure differs from NOX-1 and enables the protein to directly produce H₂O₂ (76, 77). It has been suggested that the predominant factor controlling NOX-4-dependent ROS formation is the expression level of the enzyme (44); therefore, the knowledge of the mechanisms responsible of its expression is very important.

It seems now accepted that NOX-4 is constitutively active (56). However, less clear is whether NOX-4 expression can be modulated and variable data regarding NOX-4 induction are found in the literature. Thus, hypoxia induces NOX-4 expression in pulmonary artery SMC (78, 79) and TGF- β induces NOX-4 in cardiomyocytes and vascular cells (80-82). However, thrombin, PDGF and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) ligands reduce NOX-4 expression in VSMCs and endothelial cells, (57, 83, 84). Moreover, other stimuli including AngII and IL-1 β have demonstrated to up-regulate, decrease or no affect NOX-4 expression in vascular cells (57, 58, 76, 83, 85). Our group has proposed that IL-1 β decreases NOX-4 expression in VSMCs and consequently H₂O₂ production involved in cell migration (72). Reasons for these differences remain elusive but different locations in different cell types or presence of different NOX-4 isoforms might contribute to the observed findings (54).

In vivo studies have tried to shed light on the role of NOX-4 in cardiovascular disease; however, findings are still far from being conclusive. Depending on the pathology or the blood vessel studied, increased, decreased or unchanged NOX-4 expression can be found (56). Thus, in SHR, NOX-4 levels have been reported to be unchanged in aged aorta (86). In contrast, NOX-4 mRNA expression seems to be higher in basilar arteries (87) or aorta (64) from SHR compared to normotensive Wistar-Kyoto rats. Similarly, increased NOX-4 expression has been observed in the renal cortex of aldosterone-salt rats and in aorta of AngII-infused mice (88, 89). In human atherosclerosis, NOX-4 expression is increased in intimal lesions of coronary arteries (67); however, in experimental atherosclerosis, NOX-4 expression is unchanged in the aorta of ApoE^{-/-} mice or in primate models (90, 91).

NOX-4 regulation seems to be mostly transcriptional (Figure 9). NOX-4 has been proposed to be a housekeeping gene because its promoter region contains many GC bases (92). E2F1 transcription factor is involved in the basal NOX-4 expression in rodent VSMCs (93). Sp3 and three GC-boxes containing putative Sp/Klf binding sites are also essential for the basal expression of the NOX-4 gene (94). Furthermore, in human endothelial cells, NOX-4 basal transcription is dependent of the deacetylation of transcription factor(s) and polymerase(s) (95). Regarding the inducible expression of NOX-4, JAK/STAT and NF- κ B seem to be involved in NOX-4 expression in response to IFN- γ or TNF- α (60, 71). In addition, hypoxia induces NOX-4 through a hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) dependent mechanism contributing to maintain ROS levels in smooth muscle cells from pulmonary artery (79). However, the mechanisms whereby NOX-4 is down-regulated are poorly understood. JunD, a member of the AP-1 family of transcription factors, is emerging as a major gatekeeper against oxidative stress. Interestingly, JunD knockout mice show an increased vascular expression of NOX-4 (96). However, additional mechanisms might contribute to NOX-4 down-regulation in response to different stimuli. Our group has suggested that a repressor of new synthesis is necessary for IL-1 β -mediated NOX-4 transcriptional down-regulation which binds to NOX-4 proximal promoter (72).

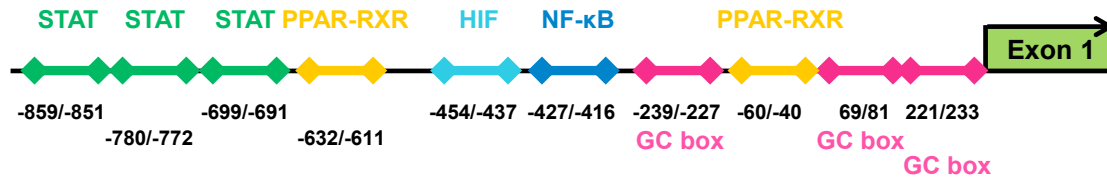


Figure 9. Structure of human NOX-4 gene promoter. Binding sites for transcription factors involved in NOX-4 expression. Retinoid X receptor (RXR).

3.2. Role of NOX-derived ROS in vascular remodeling

NOXs are important in physiological processes including host defense, aging, and cellular homeostasis. However, the up-regulation of different NOXs, including NOX-1 and NOX-4, has been implicated in several cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, diabetes, ischemia/reperfusion, restenosis or abdominal aortic aneurysms. Thus, NOX-derived ROS contribute to the oxidative stress, vascular inflammation, endothelial dysfunction and vascular remodeling observed in these cardiovascular pathologies (1, 34, 52-54, 99). The mechanisms whereby NOX-derived ROS contribute to altered vessel structure include modulation of cell growth, apoptosis, migration, inflammation and ECM production (1, 25). This is based on both *in vitro* and *in vivo* studies using genetically modified animals and experimental models of hypertension, atherosclerosis, aneurysms and others. However, although a causal relationship has clearly been demonstrated in many animal studies, an effective ROS-modulating therapy still remains to be established by clinical studies. In addition, despite of the amount of literature available on this subject, the regulation of specific NOXs in vascular cells is not completely understood.

As mentioned, many *in vitro* studies have demonstrated the role of oxidative stress as facilitator of different processes leading to vascular remodeling (26, 41, 50). In addition, several studies in different animal models, have demonstrated the key role of ROS from different origins in vascular remodeling in cardiovascular diseases such as hypertension. Thus, in stroke-prone SHR, tempol, a SOD analogue, decreased vascular $O_2^{\cdot-}$ concentration, increased antioxidant status and reduced vascular remodeling observed in this hypertensive model (100). Accordingly, in the AngII-infused mouse and deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertensive rat models, apocynin, a non-specific NADPH oxidase inhibitor, prevented structural alterations and collagen deposition (64, 101, 102). Finally, mito-TEMPO, a mitochondria-targeted SOD mimetic, also reduced structural alterations induced by AngII infusion (64). On the other hand, exercise training induces beneficial effects in the structure and/or mechanics of resistance arteries in hypertension probably through effects on oxidative stress (24). In addition, different drugs (angiotensin-converting-enzyme inhibitors and AngII and mineralocorticoid receptor blockers) with demonstrated beneficial effects on vascular remodeling are able to reduce ROS generation in experimental models and in

humans with cardiometabolic pathologies (9, 103). Besides having a role on hypertensive vascular remodeling, ROS are also involved in vascular remodeling in the context of other cardiovascular diseases such as abdominal aortic aneurysms or atherosclerosis and the reader is referred to excellent reviews on this subject (104, 105).

Regarding the specific NOX isoform involved in vascular remodeling, genetic manipulation *in vitro* or *in vivo* using transgenic knockout or overexpressing mice have yielded additional although not conclusive results. It seems that NOX-1-derived ROS are implicated in migration of different cell types, such as in VSMCs stimulated with thrombin, PDGF or bFGF (106, 107). NOX-1 also plays a role in proliferation since targeting NOX-1 with antisense or siRNA or genetic deletion in VSMCs inhibits proliferation induced by different stimuli (107-109). Similarly, in the wire injury-induced neointima formation model, both proliferation and apoptosis were reduced in NOX-1 knockout mice (NOX-1^{-/-}) but there was little difference in mice overexpressing NOX-1 compared with wild type mice (107). Accordingly, proliferation and migration were reduced in response to PDGF in cultured NOX-1^{-/-} VSMCs and increased along with ECM production in cells overexpressing NOX-1 compared with wild type VSMCs (107), suggesting that NOX-1 is required for the neointima formation. Several studies have evaluated the role of NOX-1 in vascular remodeling in response to AngII. AngII induces VSMC proliferation and migration as well as carotid artery hyperplasia in rats via AT₁R interaction with NOX-1 (26). Interestingly, in response to AngII, NOX-1^{-/-} mice showed a marked reduction in aortic media hypertrophy (110, 111), but this reduction was due to a marked decrease in ECM accumulation and not in the number of VSMCs since AngII-induced VSMC proliferation was conserved (110). Conversely, (112) demonstrated that AngII did elicit similar hypertrophic response in the thoracic aorta of NOX-1^{-/-} and NOX-1^{y/+} mice although superoxide production was blunted in NOX-1^{-/-}. According to these findings, our group has also demonstrated that AngII plus IL-1 β induced NOX-1-dependent VSMC migration (72). Finally, transgenic mice overexpressing NOX-1 in VSMCs showed markedly greater superoxide production, systolic blood pressure and aortic hypertrophy in response to AngII than their littermate controls, which were partially reversed by tempol treatment (52). Altogether, these findings suggest that cell specific location of NOX-1 might be the key to modulate hypertrophic vascular remodeling being NOX-1 from VSMCs of fundamental importance.

Regarding mechanisms activated by NOX-1-derived ROS, it has been demonstrated that in the presence of some stimuli, NOX-1 activates different proteins involved in cell adhesion and migration such as paxilin, Rac, RhoA and cofilin (44). Moreover, recently NOX-1 has been shown to be involved in matrix metalloproteinase-9 expression, a metalloproteinase essential in cell migration since NOX-1 siRNA reduced matrix metalloproteinase-9 expression (44).

The functional role of NOX-4 in vascular cells is under debate (54, 56). NOX-4 depletion leads to a loss of differentiation markers gene expression in adult VSMCs, while in mouse embryonic stem cells, NOX-4 overexpression increased VSMC differentiation markers (113, 114). These results suggest that NOX-4 contributes to the maintenance of a differentiated state of the cell preventing cell activation or proliferation (44, 54, 113, 115), suggesting a protective effect of NOX-4. However, transgenic mice with cardiac specific overexpression of NOX-4 showed decreased left ventricular function with enhanced $O_2^{\cdot-}$ production in the heart, which was accompanied by increased apoptosis and fibrosis, suggesting a deleterious role for NOX-4 (116). Interestingly, NOX-4^{-/-} mice developed exaggerated contractile dysfunction, hypertrophy and cardiac dilatation during exposure to chronic overload, whereas mice with cardiomyocyte-targeted overexpression of NOX-4 were protected (117). The different functions of NOX-4 might also depend on the disease model or stimulus to be studied (56). In the AngII-infused mouse model, aortas from NOX-4-deficient animals developed increased inflammation, media hypertrophy and endothelial dysfunction compared to their wild type littermates (111) suggesting that NOX-4 might act as a protective enzyme. Besides acting on differentiation, proliferation and migration, NOX-4 has a role in other processes involved in vascular remodeling such as apoptosis, senescence and cell cycle (54). Indeed, 7-ketocholesterol-induced apoptotic events were abolished silencing NOX-4 expression, while NOX-4 down-regulation inhibited TGF- β 1-dependent cell proliferation in VSMCs and PASMCs respectively by regulating ROS production and signaling cascades (81, 118). Thus, it has been suggested that NOX-4 might regulate fundamental cellular processes that contribute to each of these responses (54).

Reasons for so different roles for NOX-1 and NOX-4 in vascular biology are far from being clarified. As mentioned, NOX-4 is a special NOX because it has a high constitutive activity, is highly expressed in some cells such as endothelial cells and its subcellular location is different to other NOXs (56). Moreover, different from NOX-1 and NOX-2, NOX-4 releases predominantly H_2O_2 . Although not extensively studied, H_2O_2 in the media and endothelial layers may have different functions. Thus, smooth muscle-specific catalase overexpression blocks the H_2O_2 -mediated AngII-induced vascular hypertrophy (119) whereas endothelial-specific catalase overexpression prevents exercise-stimulated induction of eNOS (120). Future

studies with improved tools will reveal the true nature of the role of NOX-4 in both health and disease (56).

4. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

ROS production in the vasculature by vascular and non-vascular cells is a highly regulated process. ROS act as signaling molecules, mainly through oxidative modification of proteins and subsequent activation or inhibition of different proteins involved in different processes including cell signaling or gene transcription. In cardiovascular diseases, ROS contribute to vascular injury by promoting among other processes vascular cell growth, migration, ECM protein deposition, activation of matrix metalloproteinases or inflammation, which in turn will favor vascular remodeling. The NADPH oxidase family, is an important source of ROS in the arterial wall during cardiovascular diseases and modulate vascular remodeling. As for the specific NOX isoform NOX-1 and NOX-4 seem to be particularly important, however, it is well known that activation of other NOXs (NOX-2 and NOX-5) also contribute to $O_2^{\cdot-}$ production in rodent and/or human VSMCs (54). The above findings suggest that strategies to reduce ROS may have therapeutic potential in cardiovascular alterations in patients. However, results in humans on this aspect have been not clarifying (34). It has been proposed that prevention of ROS generation using specific inhibitors of ROS producing enzymes such as those of the NADPH oxidase family may be better to reduce oxidative stress than attempting to scavenge ROS once they have generated (1). However, to date no selective inhibitors of NOX that can be used in clinics have been developed. Long-term awaited studies are necessary to know if such strategies would be useful in vascular remodeling associated to cardiovascular diseases.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Studies performed by the authors were supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-36400), Instituto de Salud Carlos III (Red Investigación Cardiovascular RD12/0042/0024, PI13/01488) and COST BM1301. AA, MSA and AMB were supported by a FPI and FPU fellowship and the Ramón y Cajal program (RYC-2010-06473), respectively.

6. REFERENCES

1. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 453-71.
2. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Hypertension* 2011; 57:132-40.
3. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2011; 31: 986-1000.

4. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol Rev* 2009; 89: 957-89.
5. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 2009; 3: 287-310.
6. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330: 1431-8.
7. Renna NF, de las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. *Int J Hypertens* 2013; 2013: 808353.
8. Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: Can we define this?. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 9-13.
9. Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertension* 2012; 59: 367-74.
10. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 581-7.
11. Nørrelund H, Christensen KL, Samani NJ, Kimber P, Mulvany MJ, Korsgaard N. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 301-8.
12. Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, González MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salaices M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H193-201.
13. Chandesris MO, Azarine A, Ong KT, Taleb S, Boutouyrie P, Mousseaux E, Romain M, Bozec E, Laurent S, Boddart N, Thumerelle C, Tillie-Leblond I, Hoarau C, Lebranchu Y, Aladjidi N, Tron F, Barlogis V, Body G, Munzer M, Jaussaud R, Suarez F, Clément O, Hermine O, Tedgui A, Lortholary O, Picard C, Mallat Z, Fischer A. Frequent and widespread vascular abnormalities in human signal transducer and activator of transcription 3 deficiency. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5: 25-34.
14. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual process of remodeling and growth. *Hypertension* 1993; 21: 391-7.
15. Rizzoni D, Agabiti-Rosei E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern Emerg Med* 2012; 7: 205-12.
16. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res* 2002; 39: 12-20.
17. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Micieli M, Agabiti-Rosei E. Prognostic significance of smallartery structure in hypertension. *Circulation* 2003; 108: 2230-5.
18. Mathiassen ON, Buus NH, Sihm I, Thybo NK, Mørn B, Schroeder AP, Thygesen K, Aalkjaer C, Lederballe O, Mulvany MJ, Christensen KL. Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25: 1021-6.
19. Moore WS. Vascular and Endovascular Surgery: A Comprehensive Review. Available from: <http://www.inkling.com/read>. Accessed: 16th September 2014.
20. van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet* 2012; 3: 290.
21. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 614-24.
22. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2238-44.
23. Kawasaki T, Dewerchin M, Lijnen HR, Vreys I, Vermylen J, Hoylaerts MF. Mouse carotid artery ligation induces platelet-leukocyte-dependent luminal fibrin, required for neointima development. *Circ Res* 2001; 88: 159-66.
24. Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, Galán M, Martínez-Revelles S, Avendaño MS, Cachofeiro V, Fernandes T, Vassallo DV, Oliveira EM, Salaices M. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 686-703.
25. Xu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodeling in hypertension: still alive. *Canadian Journal of Cardiology* 2006; 22: 947-51.
26. Valente AJ, Yoshida T, Murthy SN, Sakamuri SS, Katsuyama M, Clark RA, Delafontaine P, Chandrasekar B. Angiotensin II enhances AT1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT1, Nox1, and interleukin-18. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303: H282-96.
27. Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, Tateno K, Ito K, Kudo-Sakamoto Y, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Kobayashi Y, Komuro I. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2013; 36: 859-65.
28. Chiou WF, Chen CC, Wei BL. 3,4-Di-O-Caffeoylquinic Acid Inhibits Angiotensin-II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Downregulating the JNK and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 634502.
29. Bush E, Maeda N, Kuziel WA, Dawson TC, Wilcox JN, DeLeon H, Taylor WR. CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 2000; 36: 360-3.

30. De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2106-13.
31. Harrison DG. The immune system in hypertension. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2014; 125: 130-40.
32. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 2007; 39: 86-93.
33. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res* 2011; 34: 5-14.
34. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 164-82.
35. Frazziano G, Champion HC, Pagano PJ. NADPH oxidase-derived ROS and the regulation of pulmonary vessel tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H2166-77.
36. Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126: 111-21.
37. Dikalov SI. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 1289-301.
38. Lacy F, Gough DA, Schmid-Schönbein GW. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:720-7.
39. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, Mueller M, Drexler H. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 943-8
40. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signaling* 2008; 10: 1115-26.
41. Al Ghouleh I, Rodríguez A, Pagano PJ, Csányi G. Proteomic Analysis Identifies an NADPH Oxidase 1 (Nox1)-Mediated Role for Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 2 (ARPC2) in Promoting Smooth Muscle Cell Migration *Int J Mol Sci* 2013; 14: 20220-35.
42. Ebrahimian T, Touyz RM. Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1127-36.
43. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:579-91.
44. Schröder K. NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 2043-58.
45. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 135-42.
46. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011; 194: 7-15.
47. Stanley A, Thompson K, Hynes A, Brakebusch C, Quondamatteo F. NADPH oxidase complex-derived reactive oxygen species, the actin cytoskeleton, and rho GTPases in cell migration. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 2026-42.
48. Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct* 2011; 792639.
49. Amanso AM, Griendling KK. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 1044-64.
50. Bruder-Nascimento T, Chinnasamy P, Riascos-Bernal DF, Cau SB, Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Sibinga NE. Angiotensin II induces Fat1 expression/activation and vascular smooth muscle cell migration via Nox1-dependent reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 66: 18-26.
51. Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, Griendling KK. Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2004; 94: 1219-26.
52. Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 2005; 112: 2668-76.
53. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NFkappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem* 2006; 281: 5657-67.
54. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012; 110: 1364-90.
55. Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause KH. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 920-9.
56. Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJR. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol* 2012; 3: 412.

57. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin QQ, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001; 88: 888-94.
58. Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, Quinn MT, Salaices M, Touyz RM. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens* 2011; 5: 137-53.
59. Katsuyama M, Fan C, Arakawa N, Nishinaka T, Miyagishi M, Taira K, Yabe-Nishimura C. Essential role of ATF-1 in induction of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase: involvement of mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2005; 386(Pt 2): 255-61.
60. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. JAK/STAT Signaling Pathway Regulates Nox1 and Nox4-Based NADPH Oxidase in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010a; 30: 105-12.
61. Martín A, Perez-Girón JV, Hernanz R, Palacios R, Briones AM, Fortuño A, Zalba G, Salaices M, Alonso MJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens* 2012; 30: 315-26.
62. Wang P, Tang F, Li R, Zhang H, Chen S, Liu P, Huang H. Contribution of different Nox homologues to cardiac remodeling in two-kidney two-clip renovascular hypertensive rats: effect of valsartan. *Pharmacol Res* 2007; 55: 408-17.
63. Nakano D, Kurumazuka D, Nagai Y, Nishiyama A, Kiso Y, Matsumura Y. Dietary sesamin suppresses aortic NADPH oxidase in DOCA salt hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35: 324-6.
64. Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18: 51-65.
65. Szöcs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 21-7.
66. Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res* 2002; 91: 54-61.
67. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1429-35.
68. Kalinina N, Agrotis A, Tararak E, Antropova Y, Kanellakis P, Ilyinskaya O, Quinn MT, Smirnov V, Bobik A. Cytochrome b558-dependent NAD(P)H oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 2037-43.
69. Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 849-54.
70. Cevik MO, Katsuyama M, Kanda S, Kaneko T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Kakehi T, Cui W, Sasaki M, Yabe-Nishimura C. The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 351-5.
71. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010b; 396: 901-7.
72. Aguado A, Zhenyukh O, Fischer T, Rodríguez C, Martínez J, Martínez-Revelles S, Aras R, Dixon DA, Briones AM, Salaices M. Different regulation of vascular NOX-1 and NOX-4 expressions by interleukin-1 β and angiotensin II. *Frontiers in Cardiovascular Biology* 2014. Barcelona (July 2014). *Cardiovascular Research* 07/2014 103 (suppl 1):S131
73. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 677-83.
74. Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF Jr. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* 2008; 181: 1129-39.
75. Helmcke I, Heumüller S, Tikkanen R, Schröder K, Brandes RP. Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 1279-87.
76. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1340-51.
77. Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, and Brandes RP. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem* 2011; 286: 13304-13.
78. Mittal M, Roth M, König P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hänze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HH, Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit

- NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res* 2007; 101: 258-67.
79. Diebold I, Petry A, Hess J, Görlach A. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 2087-96.
 80. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005; 97: 900-7.
 81. Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, Karwande SV, Stringham JC, Bull DA, Gleich M, Kennedy TP, Hoidal JR. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L661-73.
 82. Sturrock A, Huecksteadt TP, Norman K, Sanders K, Murphy TM, Chitano P, Wilson K, Hoidal JR, Kennedy TP. Nox4 mediates TGF-beta1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L1543-55.
 83. Ellmark SHM, Dusting GJ, Tang Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 495-504.
 84. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C899-905.
 85. Richard D, Wolf C, Barbe U, Kefi K, Bausero P, Visioli F. Docosahexaenoic acid down-regulates endothelial Nox 4 through a sPLA2 signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389: 516-22.
 86. Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K, Schmidt HH. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension* 2010; 56: 490-7.
 87. Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG. Increased NADPH oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke* 2004; 35: 584-9.
 88. Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002; 90: E58-65.
 89. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, Kondo S, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 43: 841-8.
 90. Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG, Drummond GR. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H24-32.
 91. Stanic B, Pandey D, Fulton DJ, Miller FJ Jr. Increased epidermal growth factor-like ligands are associated with elevated vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in a primate model of atherosclerosis. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 2012; 32: 2452-60.
 92. Katsuyama M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. *J Clin Biochem Nutr* 2012; 50: 9-22.
 93. Zhang L, Sheppard OR, Shah AM, Brewer AC. Positive regulation of the NADPH oxidase NOX4 promoter in vascular smooth muscle cells by E2F. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 679-85.
 94. Katsuyama M, Hirai H, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Sp3 transcription factor is crucial for transcriptional activation of the human NOX4 gene. *FEBS J* 2011; 278: 964-72.
 95. Siuda D, Zechner U, El Hajj N, Prawitt D, Langer D, Xia N, Horke S, Pautz A, Kleinert H, Förstermann U, Li H. Transcriptional regulation of Nox4 by histone deacetylases in human endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 2012; 107: 283.
 96. Paneni F, Osto E, Costantino S, Mateescu B, Briand S, Coppolino G, Perna E, Mocharla P, Akhmedov A, Kubant R, Rohrer L, Malinski T, Camici GG, Matter CM, Mehta-Grigoriou F, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F. Deletion of the activated protein-1 transcription factor JunD induces oxidative stress and accelerates age-related endothelial dysfunction. *Circulation* 2013; 127: 1229-40, e1-21.
 97. Varga ZV, Kupai K, Szűcs G, Gáspár R, Pálóczi J, Faragó N, Zvara A, Puskás LG, Rázga Z, Tiszlavicz L, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Ferdinandy P, Csont T. MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 62: 111-21.
 98. Peshavariya H, Jiang F, Taylor CJ, Selemidis S, Chang CW, Dusting GJ. Translation-linked mRNA destabilization accompanying serum-induced Nox4 expression in human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2399-408.
 99. Raaz U, Toh R, Maegdefessel L, Adam M, Nakagami F, Emrich FC, Spin JM, Tsao PS. Hemodynamic regulation of reactive oxygen species: implications for

- vascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 914-28.
100. Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2002;15(1 Pt 1): 78-84.
 101. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; 22: 535-42.
 102. Chen QZ, Han WQ, Chen J, Zhu DL, Chen-Yan, Gao PJ. Anti-stiffness effect of apocynin in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats via inhibition of oxidative stress. *Hypertens Res* 2013; 36: 306-12.
 103. Sedeek M1, Montezano AC, Hebert RL, Gray SP, Di Marco E, Jha JC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Schiffrin EL, Wilkinson-Berka JL, Touyz RM. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies. *J Cardiovasc Transl Res* 2012; 5: 509-18.
 104. McCormick M, Gavrilu D, Weintraub N. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2007; 27: 461-9.
 105. Goncharov NV, Avdonin PV, Nadeev AD, Zharkikh IL, Jenkins RO. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 1134-46.
 106. Schröder K, Helmcke I, Palfi K, Krause KH, Busse R, Brandes RP. Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1736-43.
 107. Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD, Lassegue B, Griendling KK. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 480-7.
 108. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase mox1. *Nature* 1999; 401: 79-82.
 109. Wang X, Sun Z. Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: discovery of a new tralpa1-nox1 pathway. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 368-80.
 110. Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F, Krause KH. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* 2006; 580: 497-504.
 111. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM, Brandes RP. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 2012; 110: 1217-25.
 112. Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 2005; 112: 2677-85.
 113. Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassegue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 42-8.
 114. Xiao Q, Luo Z, Pepe AE, Margariti A, Zeng L, Xu Q. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by nox4-produced h2o2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296: C711-23.
 115. Schröder K, Wandzioch K, Helmcke I, and Brandes RP. Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 239-45.
 116. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 2010; 106: 1253-64.
 117. Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 18121-6.
 118. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'Dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidalo MA, Lizard G, Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10703-17.
 119. Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Taylor WR. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H2O2. *Hypertension* 2005; 46: 732-7.
 120. Lauer N, Suvorava T, Ruther U, Jacob R, Meyer W, Harrison DG, Kojda G. Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 254-62.



A brief updated report on the battle against malaria

Title in Spanish: *Una breve revisión actualizada de la batalla contra la malaria*

Carmen Avendaño

¹Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

ABSTRACT: The end results of the RTS,S/AS01 malaria vaccine Phase 3 trials have moved us to comment the expectations that it has raised in the context of a brief updated report that aims at showing how recent knowledge on mechanisms used by the parasite to evade the host immune system and to develop resistance may promote the development of new vaccines and the design of antimalarial drugs addressing new targets.

RESUMEN: La culminación de los ensayos clínicos en Fase III de la vacuna RTS,S/AS01 nos ha motivado a comentar sus expectativas dentro de una pequeña revisión que pretende mostrar cómo los nuevos conocimientos sobre los mecanismos que utiliza el plasmodio para evadir el sistema inmunológico y para desarrollar resistencias, pueden incidir en el desarrollo de vacunas y en el diseño de fármacos antimaláricos dirigidos a nuevas dianas.

*Corresponding Author: avendano@farm.ucm.es

Received: June 29, 2015 Accepted: July 14, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 145-157

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es la enfermedad parasitaria de mayor impacto si se considera el número de habitantes o viajeros que enferman anualmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, especialmente en África, así como su impacto socioeconómico. Pese al importante descenso en el número de casos y fallecimientos observado desde el año 2000, aún se producen cada año más de medio millón de muertes, en su mayoría niños menores de cinco años. El Dr. Hiroki Nakatani, Director General Adjunto de la OMS para VIH, tuberculosis, malaria y enfermedades tropicales poco atendidas, ha manifestado con motivo de la celebración del Día Mundial de la Malaria el 25 de abril de 2015 que es urgente reducir el sufrimiento que produce esta enfermedad expandiendo las medidas de prevención y mejorando los medios de diagnóstico y tratamiento. La OMS recomienda que las mujeres embarazadas y los menores de cinco años, que son los grupos más vulnerables, reciban un tratamiento preventivo. En 2013 alrededor de 198 millones de personas se vieron afectadas por la malaria en África, sólo uno de cada cinco niños enfermos siguió un tratamiento, 15 millones de mujeres embarazadas no recibieron ninguna de las dosis recomendadas para prevenir el contagio, y unos 278 millones de personas no disponían en sus casas de mosquiteras tratadas con insecticidas (un método de prevención muy eficaz).

Actualmente la malaria se considera una enfermedad reemergente debido a distintos factores, entre los que se incluyen la resistencia a los insecticidas por parte de los mosquitos del género *Anopheles*, cuyas hembras son los vectores de la enfermedad, la inestabilidad que producen

las migraciones y la exposición de personas no inmunes a áreas donde la malaria es endémica, las dificultades para desarrollar vacunas efectivas, y la rápida aparición y diseminación de resistencias a los fármacos antimaláricos, que ha requerido el uso de tratamientos cada vez más caros, más tóxicos y más largos (1).

Esta enfermedad se ha erradicado en los países desarrollados aplicando una estrategia basada en el control del mosquito, en la aplicación de nuevos tratamientos contra el plasmodio (que es el agente patógeno), y en una mejora de la educación y de las condiciones de salud. Lo mismo debería hacerse en todo el mundo, siendo también muy deseable el desarrollo de vacunas eficaces y de métodos de diagnóstico seguros, rápidos y económicos. Actualmente se conocen alrededor de 200 especies del género *Plasmodium*, de las cuales al menos 11 pueden infectar a humanos, aunque las más comunes son *P. ovale*, *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. La más dañina es *P. falciparum*, responsable del 90% de las muertes. Para su total erradicación son necesarios tratamientos preventivos o curativos que sean eficaces en todas las fases del complejo ciclo vital de estos parásitos, que se desarrolla entre los mosquitos como vectores y los vertebrados como huéspedes.

2. CICLO VITAL DEL PLASMODIO

Cuando el mosquito hembra del género *Anopheles* pica a una persona infectada por plasmodio introduce en su estómago sangre que contiene, además de la hemoglobina necesaria para la maduración de sus huevos, formas intraeritrocitarias y gametocitos masculinos y femeninos

de este parásito. Las primeras son destruidas rápidamente, pero los gametocitos sobreviven e inician el ciclo sexuado en el estómago del mosquito. Tras la fecundación de un gameto hembra por un gameto macho se forma un cigoto diploide (ooquinet) que atraviesa la pared estomacal y se adhiere a la cara externa de esta pared, convirtiéndose en ooquiste. El desarrollo de éste conduce a la producción asexual de numerosos esporozoítos haploides que, al liberarse, se dispersan en el cuerpo del mosquito. Todo el ciclo vital del parásito en el insecto dura entre 4 y 15 días, dependiendo de la temperatura ambiente. En el momento de la picadura en la sangre del hospedador, los esporozoítos presentes en las glándulas salivares del mosquito se inyectan con su saliva, comenzando el ciclo asexual o esquizogonia del parásito. En los humanos hay dos fases de multiplicación asexual: la primera ocurre en los hepatocitos (esquizogonia exoeritrocitaria), donde penetran los esporozoítos abandonando el sistema vascular, y la segunda en los glóbulos rojos (esquizogonia

eritrocitaria). En los hepatocitos, los esporozoítos alcanzan el tamaño de un ooquiste en menos de 48 horas, aunque en las especies *P. vivax* y *P. ovale* algunos de ellos pasan por una fase de espera llamada hipnozoíto antes de empezar la multiplicación asexual. En ésta se forman los merozoítos, que se agrupan formando un esquizonte. Cuando los hepatocitos se rompen, los merozoítos liberados a la sangre invaden los glóbulos rojos, iniciando la esquizogonia eritrocitaria con la creación de un esquizonte formado por merozoítos hemáticos. Cuando éstos se liberan por la ruptura del eritrocito infectado, van a infectar a nuevos glóbulos rojos y, tras 2 ó 3 esquizogonias eritrocíticas, algunos merozoítos en lugar de convertirse en trofozoítos se desarrollan en microgametocitos y macrogametocitos. Finalmente, cuando un mosquito transmisor chupa sangre de una persona con gametocitos, éstos entrarán en la sangre del vector transmisor, perpetuándose el ciclo vital del parásito (Figura 1).

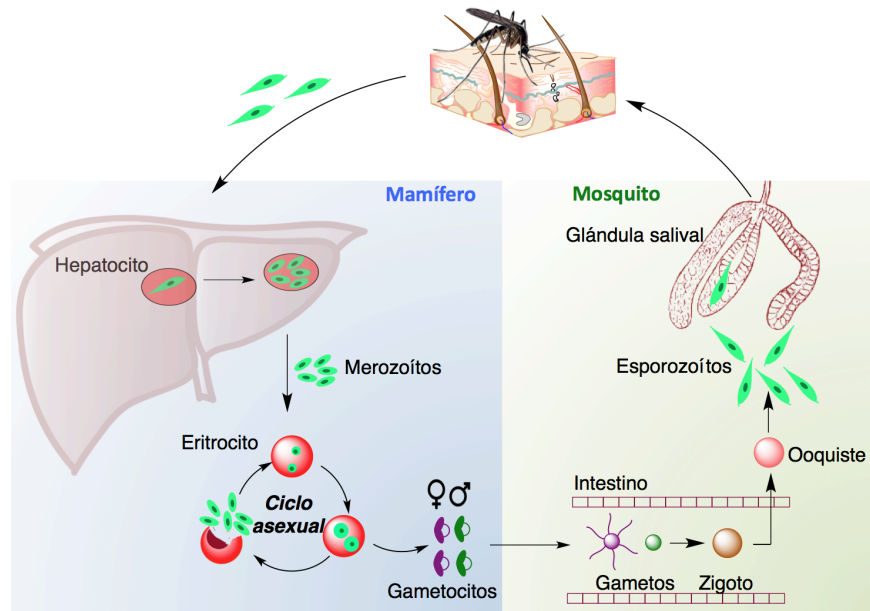


Figura 1. Ciclo vital del plasmodio.

En la ruptura de los eritrocitos se liberan también a la sangre diversos metabolitos y, cuando se rompen simultáneamente muchos glóbulos rojos, comienza la sintomatología con malestar general, escalofríos súbitos y fiebre (que llega a los 39-41 °C), pulso rápido, poliuria, cefalea y náuseas. A continuación disminuye la temperatura y se produce sudoración profusa durante 2-3 horas. Al contrario de lo que ocurre en la gripe, los episodios de fiebre se producen rítmicamente (paroxismo palúdico), ocurriendo cada 48 horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, y cada 72 horas en *P. malariae*. Si no se trata la enfermedad, se produce el fallo orgánico, el parásito se acumula en los capilares cerebrales originando un estado de coma y, finalmente, llega la muerte.

3. MÉTODOS PREVENTIVOS: VACUNAS

Los científicos han buscado una vacuna efectiva contra

la malaria a partir de los años 90, especialmente desde que en el año 2002 expertos del Reino Unido y de Estados Unidos descifrarán el mapa genético del parásito que la produce y del mosquito que la transmite. Sin embargo, aunque varias vacunas se encuentran en desarrollo todavía no se ha conseguido ninguna completamente efectiva, debido fundamentalmente al gran pleomorfismo genético del plasmodio (existen más de 200.000 variantes de *P. Falciparum*) y a que no existe inmunidad cruzada entre especies ni entre cepas de la misma especie.

En cada una de las fases por las que atraviesa el parásito, éste produce múltiples antígenos que pueden ser inmunógenos. Las vacunas contra la fase pre-eritrocítica protegen contra los esporozoítos (forma infectante inyectada por el mosquito) o impiden la invasión de los hepatocitos; las vacunas eritrocíticas, contra la fase sanguínea, inhiben la multiplicación del parásito en los hematíes previniendo la enfermedad grave durante la

infección sanguínea; y las vacunas del estadio sexual del parásito tratan de prevenir el desarrollo de formas sexuales una vez ingeridas por el mosquito, rompiendo así el ciclo biológico del parásito. La virulencia de *P. falciparum* se atribuye al vasto repertorio de mecanismos que éste posee para evadir la respuesta inmune del hospedador. Puede variar las características de sus antígenos expresando secuencias de genes *var* y expresando moléculas de adhesión, siendo también importante su rápido desplazamiento de unas células a otras. Los esporozoítos no permanecen en la sangre el tiempo suficiente para ser marcados por anticuerpos antes de entrar en el hígado, y cuando las células T podrían eliminarlos de este órgano, ya se han transformado en merozoítos y emigrado a los eritrocitos, que modifican su membrana insertando proteínas procedentes del parásito. Por su parte, los gametocitos permanecen dentro de los eritrocitos humanos hasta que detectan un descenso de temperatura que indica que están a salvo en el intestino del mosquito, entonces emergen y se reproducen para infectar de nuevo a los humanos.

Las infecciones crónicas de malaria se caracterizan por la activación de múltiples clones de células B especialmente implicadas en la memoria inmunitaria (2), hiperglobulinemia, y títulos elevados de anticuerpos. La inmunoglobulina M (IgM), uno de estos anticuerpos, se expresa en todas las especies de vertebrados y constituye

cerca de un 10% de la inmunoglobulina plasmática. Su interacción con moléculas efectoras, como lo receptores Fc (glicoproteínas de membrana también llamadas Cluster of Differentiation 64, CD64), interviene al menos en parte en la inmunidad innata. Se sabe que a través de esta interacción, en las cepas de *P. falciparum* que poseen especial virulencia por tener un fenotipo de adhesión, la inmunoglobulina M puede aglutinar y neutralizar patógenos muy eficazmente, activando la cascada del complemento que conduce a la lisis de un eritrocito (3).

Durante el desarrollo asexual de *P. falciparum*, los eritrocitos infectados adquieren la habilidad de adherirse al endotelio vascular gracias a que el parásito exporta a la superficie de aquéllos algunas proteínas receptoras que, al interactuar con determinados ligandos, facilitan su unión a otros eritrocitos del torrente sanguíneo. Para evadir la respuesta inmunológica por la intervención de IgM y optimizar su adherencia al endotelio vascular, el plasmodio sintetiza proteínas anti-IgM, entre las que se encuentran las proteínas polimórficas EMP1 (PfEMP1), que también pueden reducir la respuesta inmunitaria adhiriéndose a células dendríticas (4). Estas proteínas son antígenos de adhesión que se expresan en la superficie de los eritrocitos infectados y se enlazan a proteínas de adhesión, como CR1, ICAM-1, CSA y CD36, de diferentes células endoteliales (Figura 2) (5).

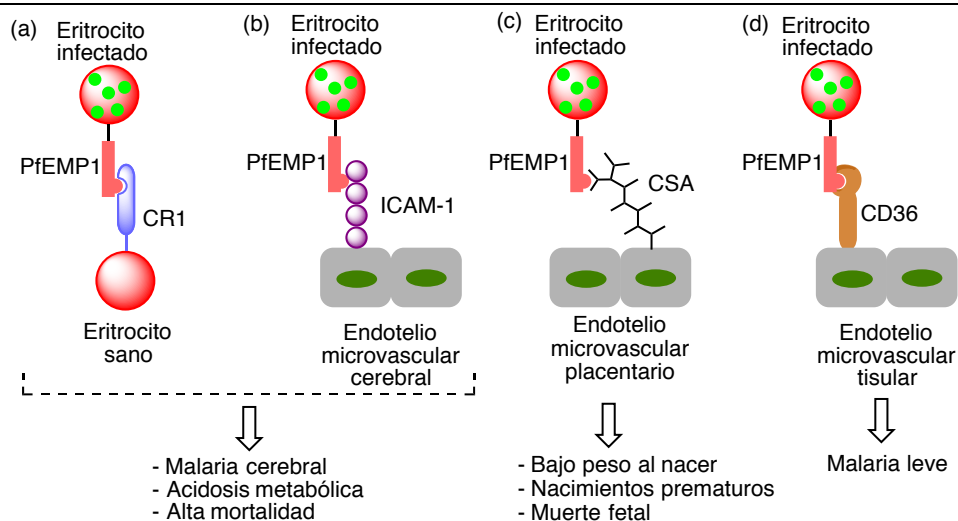


Figura 2. Enlaces de PfEMP1 a moléculas de adhesión en diferentes células endoteliales.

Un mayor conocimiento de estos procesos podría ser de utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas (6). El papel de las proteínas PfEMP1 en la patogénesis de la malaria y en las respuestas inmunes específicas, así como las posibles estrategias de vacunación basadas en ellas, se ha revisado recientemente (7).

Entre las vacunas estudiadas clínicamente, la denominada SPf66 fue la primera vacuna antimalárica sintética. Fue desarrollada por un grupo encabezado por el Dr. Patarroyo sobre la base de sintetizar péptidos inmunogénicos ya que las secuencias conservadas de las proteínas de superficie del esporozoítos no son “visibles”

para el sistema inmune (8). Esta vacuna se ensayó extensamente en áreas endémicas durante los años 90, pero demostró una eficacia insuficiente. Lo mismo ha ocurrido con otras dirigidas a la fase en que el parásito se multiplica en la sangre tras la picadura del mosquito transmisor. Entre éstas, la denominada RTS,S/AS01 (Mosquirix) ha sido la más prometedora desde los primeros resultados publicados en 2004 (9), y la primera que ha concluido recientemente los ensayos clínicos de Fase III. Su historia puede remontarse a principios de los años 1970, cuando se demostró que los esporozoítos irradiados de *P. falciparum*

y *P. vivax* inoculados en voluntarios sanos conferían inmunidad frente a la picadura de mosquitos infectados.

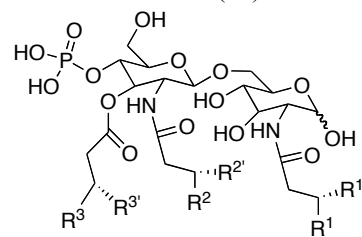
Mosquirix se ha desarrollado con la participación del Dr. Pedro Alonso, investigador del Centro de Salud Internacional del Hospital Clínico de Barcelona, y la colaboración económica de la OMS, la Fundación Bill y Melinda Gates, GlaxoSmith-Kline (GSK) y otras entidades. La "Iniciativa para la Vacuna contra la Malaria" (MVI) recibió de la Fundación Bill & Melinda Gates más de 200 millones de dólares para su desarrollo clínico, mientras que GSK ha invertido hasta el momento más de 350 millones de dólares y prevee un gasto adicional de 260 millones para terminar el proyecto. Esta empresa ha declarado que si se utiliza se comercializará al precio de coste aumentado en un 5%, que se reinvertirá en nuevas investigaciones.

Las siglas "RTS,S" representan la composición del antígeno: "R" indica la región repetida central de la proteína circumsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*, "T" los epítopos de CSP que son reconocidos por las células T, y "S" el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBsAg). Estos componentes se coexpresan en células de levadura y se combinan en la proteína de fusión "RTS". Finalmente, "RTS" y la proteína libre "S" se unen espontáneamente formando las partículas "RTS,S" (10). La utilización del antígeno de superficie de la hepatitis B ("S") como *carrier* de la región constante de la CSP de *P. falciparum* surgió en 1984, y se debe a una colaboración entre GSK y el *Walter Reed Army Institut of Research* (WRAIR).

La proteína CSP es el antígeno predominante de la superficie de los esporozoítos, anclada en su forma nativa a glicosil-fosfatidil-inositol (11). El gen que la codifica fue el primero que se identificó y clonó en *P. falciparum*, siendo la base de varias vacunas contra la malaria. Se produce en gran cantidad dentro de los oocistos situados en el epitelio intestinal de los mosquitos infectados y está implicada en la migración de los esporozoítos a las glándulas salivares de éstos y en su posterior penetración en los hepatocitos del huésped (12). Contiene una región central inmunogénica, flanqueada por las regiones N- y C-terminales (13), que está muy conservada y contiene la secuencia de aminoácidos asparragina-alanina-asparragina-prolina (NANP), repetida 40 veces, junto a algunas repeticiones de asparragina-valina-ácido aspártico-prolina (NVDP). También contiene epítopos

inmuno-dominantes de células B, mientras que la mayor parte de los epítopos responsables de la inducción de células T CD4+ y CD8+ están localizados en las regiones variables.

El componente de esta vacuna denominado AS01 es una formulación liposomal que contiene adyuvantes inmunológicos. Éstos actúan en general como formas de depósito de antígenos prolongando su vida media, pudiendo actuar además como coestimuladores de las células presentadoras del antígeno (CPA) e inducir la producción de moléculas antiinflamatorias endógenas, principalmente citocinas (en particular TNF α) y quimiocinas, que son mediadores importantes de la inmunidad innata. AS01 se ha utilizado ampliamente por GlaxoSmith-Kline para prolongar o aumentar la respuesta inmune específica de antígenos, y es una mezcla de MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) y de la saponina QS21 (14). El lípido A es el componente lipídico de lipopolisacáridos o endotoxinas localizados en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y tanto él como sus análogos aumentan la respuesta a antígenos poco inmunogénicos, incluidos los asociados a tumores. El análogo MPL puede obtenerse por hidrólisis de los grupos (R)-3-hidroxitetradecanoilo y 1-fosfato del lípido A de *Salmonella Minnesota* (15).



MPL

QS-21 es una fracción semipurificada del extracto de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* formada por glicósidos triterpénicos que posee muy buena actividad como inmuno-adyuvante (16) y puede obtenerse como compuesto puro por síntesis, al igual que sus análogos (17). Está constituida por un triterpeno central (ácido quilaico), un trisacárido ramificado en la posición C-3 del triterpeno, y un tetrasacárido lineal en la posición C-28, y un grupo acilo unido a la porción central de fucosa de dicho tetrasacárido (Figura 3).

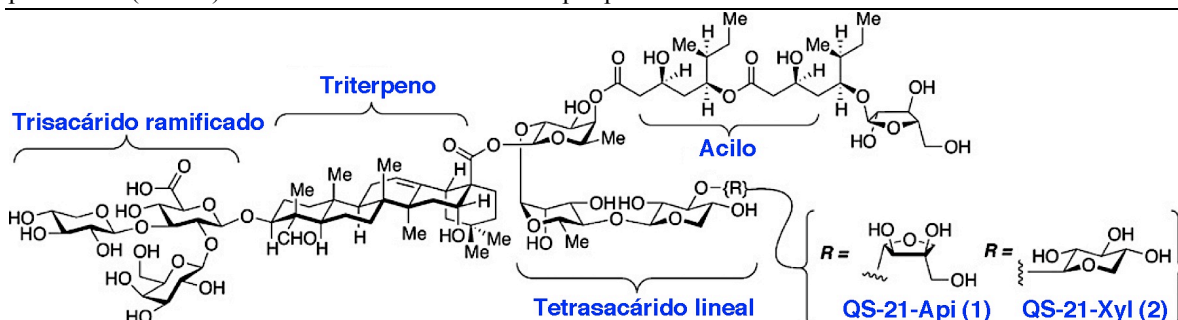


Figura 3. Estructura del inmuno-adyuvante QS-21 en sus variantes QS-21-Apiosa (1) y QS-21-Xilosa (2).

Desde marzo de 2009 a enero de 2011, en que se inició el ensayo de Fase III de la vacuna RTS,S/AS01, se reclutaron 15.459 niños de entre 6 a 12 semanas de vida y entre cinco y 17 meses para una primera inoculación en once zonas de siete países subsaharianos con diferentes niveles de transmisión de malaria (Burkina Faso, Gabón, Ghana, Kenia, Malawi, Mozambique y Tanzania) (18). El grupo denominado R3R recibió otras dos dosis al mes y a los dos meses siguientes y un dosis de refuerzo al mes 20. El grupo R3C recibió las tres primeras dosis indicadas y una vacuna de comparación en el mes 20, y al grupo C3C (de control) se administró una vacuna de comparación los meses 0, 1, 2, y 20. Los participantes en este ensayo se controlaron hasta el 31 de enero de 2014, anotándose la aparición de malaria a los 12 meses (tras la tercera dosis) en cada grupo de edad. Los resultados obtenidos demostraron una eficacia del 55,8% en niños de edades comprendidas entre 5 y 17 meses y del 31,3% en niños entre 6 y 12 semanas (19), comprobándose que la infección se evita por la inducción de un gran número de anticuerpos que impiden que el parásito infecte al hígado (20), pero la protección se desvanece con el tiempo (21). Los últimos datos publicados recientemente en la revista británica *The Lancet* incluyen los resultados obtenidos tras la aplicación de una dosis de refuerzo (22), que aumentó la titulación de anticuerpos como ya se había observado en adultos inmunizados en la formulación anterior RTS,S/AS02 (23), pero este efecto fue transitorio.

Algunos expertos en enfermedades tropicales han expresado sus dudas acerca de si esta vacuna protege de la infección o simplemente la retrasa; sin embargo, el Dr. Brian Greenwood (de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres) ha insistido en que pese a la disminución de su eficacia con el paso del tiempo, sus beneficios son indudables, pudiendo contribuir al control de la malaria especialmente en áreas de alta transmisión si se utiliza en combinación con otras medidas. En previsión de que la opinión del CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) sea favorable, la OMS constituyó en su momento una comisión de expertos para elaborar las recomendaciones de su uso en los distintos países que decidieran adquirirla y aplicarla (24).

4. DIAGNÓSTICO

Los primeros síntomas clínicos de la malaria (fiebre, sudoración y escalofríos, dolores de cabeza y musculares, náuseas y vómitos) no son específicos, y son frecuentes en infecciones víricas. Sólo en el caso de la enfermedad severa, los síntomas clínicos (confusión, coma, anemia severa, dificultad respiratoria y otros) pueden justificar la sospecha de este diagnóstico, aunque siempre habría que confirmarlo en el laboratorio. Desgraciadamente, muchas de las áreas endémicas carecen de centros de salud convenientemente dotados, mientras que en los países en que la malaria ha dejado de ser endémica los médicos no están familiarizados con ella y pueden no considerarla como un diagnóstico posible.

Los métodos para el diagnóstico de la malaria en áreas endémicas han de ser fiables, rápidos y económicos, ya que de otra forma se diagnosticará como malaria cualquier fiebre que se produzca, aplicando tratamientos innecesarios que incidirán de forma importante en el desarrollo de resistencias. Desde que en 1880 se identificó el parásito causante del paludismo, el examen microscópico de frotis sanguíneos utilizando la tinción de Giemsa es el método más común para el diagnóstico en la mayoría de hospitales, si bien su fiabilidad puede ser inadecuada porque los laboratorios pueden carecer de la experiencia necesaria. El análisis microscópico también es necesario para cuantificar la proporción de hematíes infectados, un indicador que es importante para el pronóstico. Hay que tener en cuenta que, en países en los que la enfermedad es endémica, puede haber una gran proporción de portadores que estén infectados pero no tengan síntomas de la enfermedad porque han desarrollado suficiente inmunidad para protegerlos aunque no para infectarse. Si estas personas se ponen enfermas se encontrarán los parásitos en sangre cuando ésta se observe al microscopio, pero su enfermedad puede deberse a otras causas y no a la malaria. Los colorantes fluorescentes, como el naranja de acridina, son una de las alternativas a la tinción con Giemsa (25). Un procedimiento que permite una rápida (de 10 segundos a 3 minutos) y sensible detección de los parásitos debido al mayor volumen de sangre que se observa, es el test QBC[®] Malaria, en el que los parásitos que se encuentran en tubos con sangre centrifugada se observan directamente utilizando un microscopio de fluorescencia (26).

Además de la detección directa por microscopía, puede determinarse la presencia en la sangre de antígenos del parásito con tests inmunocromatográficos denominados RDT (*rapid diagnostic test*), que suelen tardar entre 2 y 15 minutos. ParaSightF[®] o BinaxNOW[®] Malaria, por ejemplo, son tiras reactivas o kits que contienen un anticuerpo para detectar el antígeno HRP2 (histidine-rich protein 2) (HRP2) de *P. falciparum* (una hemo-polimerasa que protege al parásito de la toxicidad del grupo hemo de la hemoglobina). Si los resultados de estas pruebas son negativos, es necesaria una confirmación posterior por análisis microscópico, porque si el número de parásitos circulantes en la sangre de un paciente es pequeño la infección puede no ser detectada. Algunos RDT no detectan las dos especies menos comunes que producen malaria, como *P. ovale* y *P. malariae*. El hallazgo de anticuerpos en el suero utilizando técnicas IFA (*indirect immunofluorescence*) o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indica que el organismo ha estado expuesto al parásito (27) y permite seleccionar a los donantes de sangre no infectados.

En los laboratorios mejor dotados es posible también un diagnóstico molecular que utiliza la técnica PCR (*polimerase chain reaction*). Éste se basa en la amplificación en cadena de la subunidad pequeña del ADN ribosómico (ADNr) del parásito presente en la sangre periférica, y su principal ventaja es su capacidad para

detectar e identificar las infecciones de bajo grado con exactitud y fiabilidad. También permite identificar la especie de plasmodio que está presente, pero las preparaciones con ADN y ARN requieren una manipulación complicada con solventes peligrosos, y un equipamiento sofisticado para la hibridación y la detección de los híbridos, así como para la amplificación mediante PCR y la detección del producto amplificado. Además, las técnicas son lentas, tardando en algunos casos 24 horas.

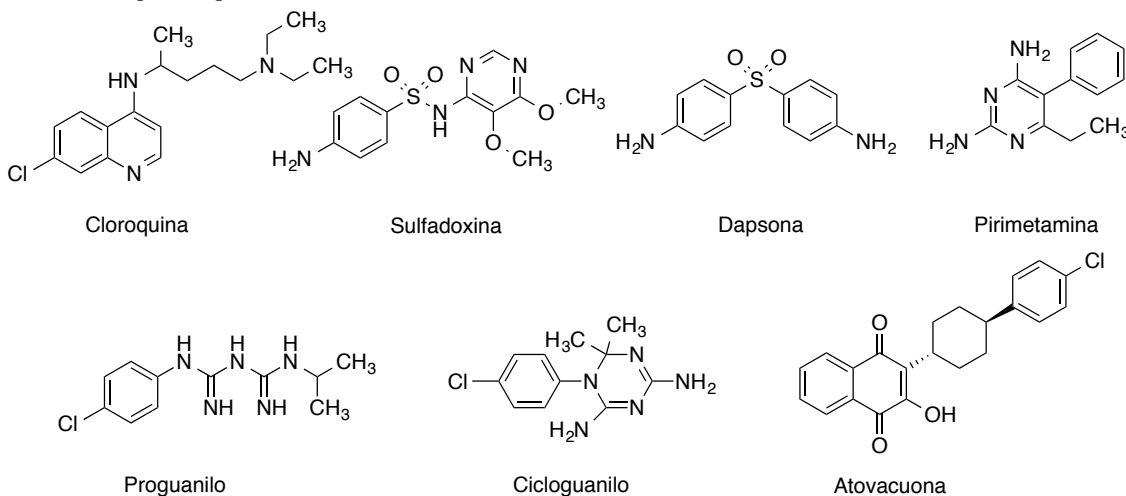
El valor de los resultados que se obtienen con los distintos procedimientos de diagnóstico dependen de la especie causante, del nivel de parasitemia y de la inmunidad del paciente. En ausencia de una determinación microscópica fiable, los kits basados en la detección de HRP2 tienen una gran sensibilidad y especificidad en áreas donde *P. falciparum* es endémico, mientras que el test de naranja de acridina es muy sensible en estudios epidemiológicos (28).

5. TRATAMIENTOS ANTIMALÁRICOS CLÁSICOS

Existen distintos tratamientos contra la malaria, pero su eficacia se ve comprometida por el desarrollo de resistencias (29). Aunque la mayoría de los antimaláricos actúa contra la fase asexual eritrocítica (30), estos fármacos deberían actuar en la etapa hepática del parásito para reducir el progreso de la infección y evitar recidivas, en la sanguínea para aliviar los síntomas clínicos, y en la gametocítica para inhibir el ciclo de transmisión y proteger a otros seres humanos.

Para conseguir el control de la malaria con tratamientos eficaces frente a cepas resistentes se siguen actualmente dos tendencias: el uso de combinaciones nuevas de fármacos ya conocidos o de sus derivados (con frecuencia derivados de aminoquinolina y de artemisinina) y el desarrollo de inhibidores específicos de nuevas dianas terapéuticas esenciales para la viabilidad del parásito. Los antimaláricos más comunes afectan a algunas de estas dianas que ya son clásicas. Por ejemplo, desde hace tiempo se conoce que el plasmodio se alimenta dentro de los

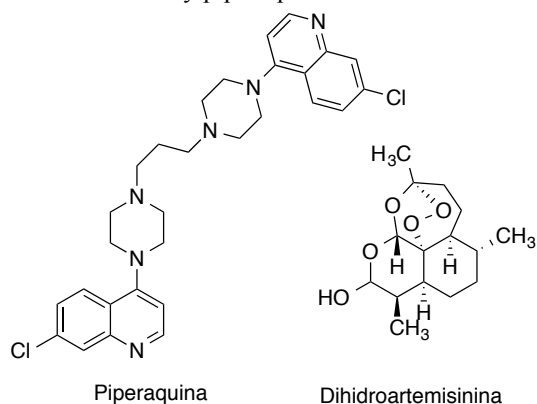
eritrocitos de la hemoglobina del huésped, que penetra en su organismo por endocitosis y se transporta a la vacuola alimenticia. Allí, enzimas proteolíticas degradan su porción proteica (globina), mientras que la porción hemo que es tóxica debido a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno a partir del oxígeno molecular, es degradada por la enzima hemo-polimerasa originando el pigmento no tóxico hemozoína. Varios fármacos antimaláricos, como la cloroquina, actúan interfiriendo la detoxificación del grupo hemo, por lo que los eritrocitos infectados experimentan el correspondiente estrés oxidativo (31). Por su carácter básico, la cloroquina se encuentra a pH 7,4 en forma del monocatión y puede atravesar las membranas biológicas penetrando en los glóbulos rojos y en la vacuola alimenticia del parásito, pero el pH ácido de ésta (5,5) la transforma en su forma diprotonada impermeable, por lo que se acumula en dicho lugar. Las sulfonamidas y las sulfonas inhiben la enzima dihidropterato sintetasa (DPHS), y muestran una toxicidad selectiva para el parásito porque éste sintetiza ácido dihidrofólico por una ruta metabólica exclusiva de los microorganismos. En esta ruta, el ácido *p*-amino-benzoico (PABA) se une a un derivado de pteridina en una reacción catalizada por DPHS, y el producto así formado se conjuga posteriormente con el ácido glutámico para dar ácido dihidrofólico. La selectividad de otros antimaláricos se debe a que el plasmodio no es capaz de utilizar las pirimidinas preformadas como lo hacen las células de los mamíferos y ha de sintetizarlas *de novo*. Por ejemplo, pirimetamina y cicloguanilo (el metabolito activo del proguanilo), inhiben la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) y son agentes antimaláricos efectivos porque en la síntesis de pirimidinas se necesita tetrahidrofolato como cofactor. Otros antimaláricos, como la atovacuona, inhiben la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), que cataliza la transformación de dihidroorotato a orotato (un intermediario en la ruta biosintética de las pirimidinas). Atovacuona es activa en las fases hepáticas y eritrocíticas de *P. falciparum* e inhibe el lugar de oxidación (Q_o) del citocromo b, como se comentará más adelante.



A brief updated report on the battle against malaria

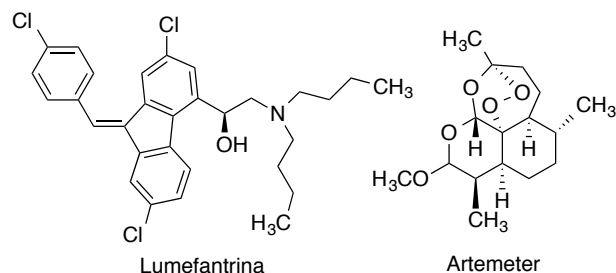
En cuanto a las combinaciones de antimaláricos, los dos componentes de la asociación sulfadoxina-pirimetamina (Fansidar[®] de Roche), producen el bloqueo secuencial de dos enzimas del parásito implicadas en la biosíntesis del ácido fólico, pero fracasan por la aparición de resistencias (32). Lo mismo ocurre con las combinaciones antifolato proguanilo-dapsona y atovacuona-proguanilo (Malarona[®] de GlaxoSmithKline) (33).

Actualmente, las terapias de combinación basadas en las artemisininas siguen siendo la piedra angular de los tratamientos contra *Plasmodium falciparum*, por lo que es comprensible la alarma que generó la detección de parásitos resistentes a las mismas que motivó el lanzamiento del “Plan Mundial de Contención de la Resistencia a la Artemisinina” en enero de 2011. No obstante, las combinaciones de derivados de artemisinina con otros antimaláricos siguió siendo esencial, como demuestra el hecho de que a finales de 2011 la Agencia Europea del Medicamento aprobara la combinación de dihidroartemisinina y piperaquina Eurartesim[®].



La artemisinina y sus derivados son endoperóxidos sesquiterpénicos que aparecieron en su momento como la mejor alternativa para el tratamiento de la malaria porque no producen resistencias fácilmente (34). Su citotoxicidad se atribuyó a la porción estructural endoperóxido y a la alta concentración de catión Fe^{2+} que poseen las células del parásito, el cual rompe homolíticamente el grupo endoperóxido para dar un alcóxido de Fe^{3+} y radicales libres que atacan a las membranas, alterando su estructura y produciendo la muerte celular (35). Por tener una vida media muy corta, las artemisininas han de combinarse con otros antimaláricos. Coartem[®], una asociación de 1 parte

del derivado de artemisinina denominado artemeter y 6 partes de lumefantrina (un inhibidor de la polimerización del grupo hemo) es una de estas combinaciones, desarrollada por la Fundación Novartis está comercializada a un precio bajo.



6. NUEVAS METODOLOGÍAS APLICADAS AL ESTUDIO DE RESISTENCIAS Y SU REPERCUSIÓN TERAPÉUTICA.

Actualmente, la resistencia a artemisininas y a otros antimaláricos se asocia a mutaciones del genoma del plasmodio. Se han encontrado casi un millón de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), aunque en su mayoría no se sabe si se corresponden o no con dianas clave para su desarrollo. Recientemente, la secuenciación del genoma de parásitos resistentes a artemisinina ha revelado 8 mutaciones de un único nucleótido en 7 genes, y éstas se han comparado con las encontradas clínicamente en países donde ya ha emergido esta resistencia, como Camboya (36). De esta forma se ha identificado una mutación clave que afecta al gen que codifica a la proteína K13, perteneciente a la familia Kelch de *P. falciparum* (PfKelch13) (37). También se ha demostrado que en las cepas resistentes a artemisininas hay un aumento de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PfPI3K), y por consiguiente de los niveles de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), una señal que tiene un papel importante en la exportación de proteínas desde el retículo endoplásmico (ER) del parásito al eritrocito (38). El aumento de los niveles de PfPI3K en las cepas resistentes se ha asociado a la mutación C580Y de PfKelch13, ya que esta mutación reduce su enlace con PfPI3K y la poliubiquitinación de esta cinasa (Figura 4).

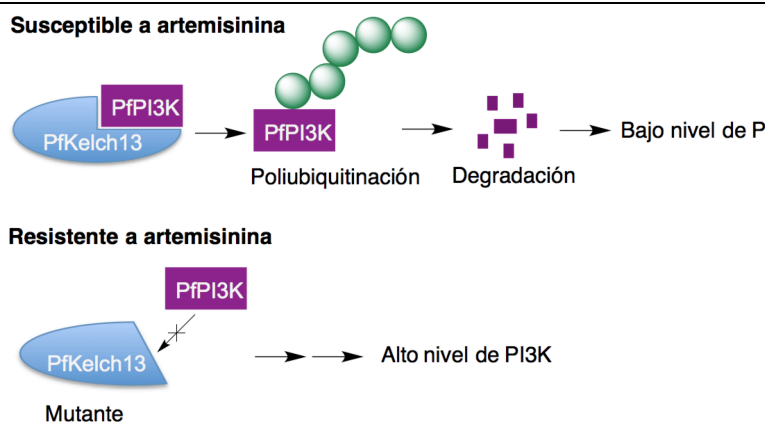


Figura 4. Resistencia a las artemisininas mediada por una mutación de PfKelch13.

Como no se dispone todavía de la estructura cristalina de PfPI3K, las interacciones entre esta enzima y el antimalárico dihidroartemisinina (DHA) se ha estudiado utilizando la dinámica molecular, observándose que DHA

se adapta perfectamente a la región hidrófoba de PfPI3K y que los lugares de interacción parecen ser el grupo hidroxilo y el oxígeno lactólico de los aminoácidos D1889 e Y1915 de la enzima (Figura 5).

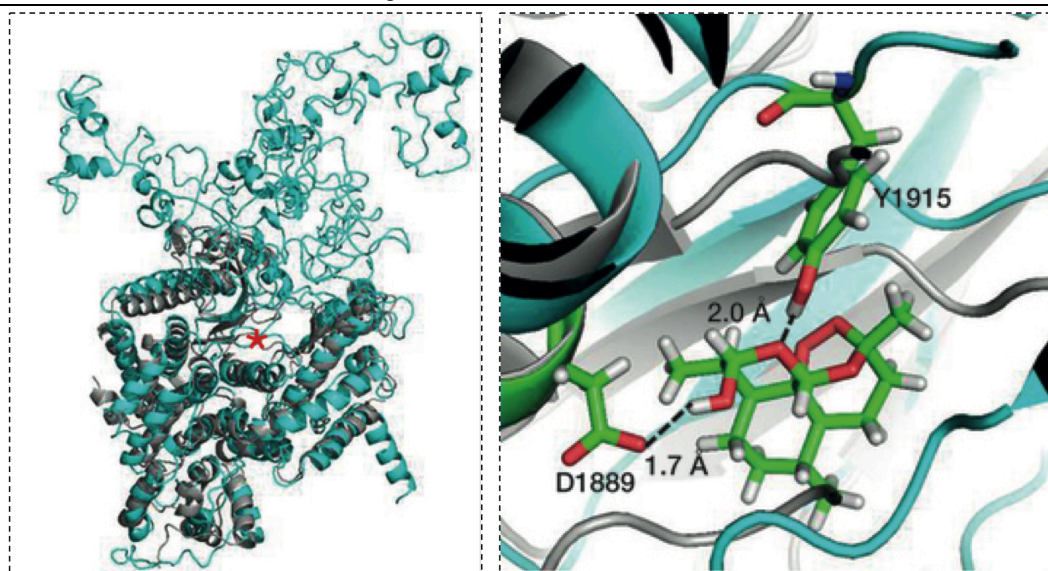


Figura 5. Interacción de dihidroartemisinina (DHA) y la cinasa PfPI3K.

Este trabajo corrobora que PI3P es un mediador de la resistencia a artemisininas, y que PfPI3K es una diana importante para eliminar la malaria (39).

7. ALGUNAS ESTRATEGIAS PAR EL HALLAZGO DE NUEVOS ANTIMALÁRICOS

En los últimos 5 años se han identificado nuevos compuestos “cabezas de serie” utilizando cribados fenotípicos y descubriendo posteriormente, a través del estudio de las respuestas celulares que inducen, cuáles son las dianas que se afectan y por tanto son claves en el proceso vital del parásito (41). El conocimiento cada vez mayor del mecanismo de acción de ciertos fármacos y de las bases moleculares de las resistencias, junto con la información esencial sobre los procesos metabólicos específicos, la diferenciación, la invasión celular, y la patogenicidad de los parásitos, que proporciona el análisis comparado del genoma, ya se está utilizando para el

desarrollo de nuevos antimaláricos (40) pero, dada la gran cantidad de ejemplos que se han publicado, nos limitamos aquí a comentar algunos.

7.1. Inhibidores de citocromo b de *P. falciparum* (PfCYTb)

Los compuestos ML238 y su análogo optimizado BRD6323 surgieron en el cribado fenotípico en parásitos de *Plasmodium falciparum* sanguíneos de una colección de unos 8.000 compuestos obtenidos por la técnica denominada DOS (*Diversity-Oriented Synthesis*). Ambos compuestos carecían de citotoxicidad para las células de mamífero y poseían una actividad antimalárica del orden nanomolar originada por mecanismos desconocidos (42). A través de la selección de los parásitos resistentes y la identificación de las modificaciones que se producen en su genoma, se comprobó que la diana de ML238 y BRD6323 es el citocromo *bc₁* del *P. falciparum* (PfCYTb) (43). Este citocromo, denominado también coenzima Q, citocromo *c*

reductasa, o ubiquinol-citocromo *c* reductasa, forma con otras dos proteínas el complejo III que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias. Este complejo interviene en la respiración celular y en la generación de ATP, está implicado en la cadena de transporte de electrones y cataliza las reacciones de óxido-reducción que transforman la forma dihidrogenada de la ubiquinona

(QH₂, ubiquinol) en su forma quinónica (Q, ó coenzima Q), mientras que el citocromo oxidado (Fe³⁺) se transforma en citocromo reducido (Fe²⁺) (Figura 6). Esta función es crítica en *P. falciparum* para la biosíntesis de pirimidinas, porque la ubiquinona es el cofactor de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa DHOD anteriormente mencionada (44).

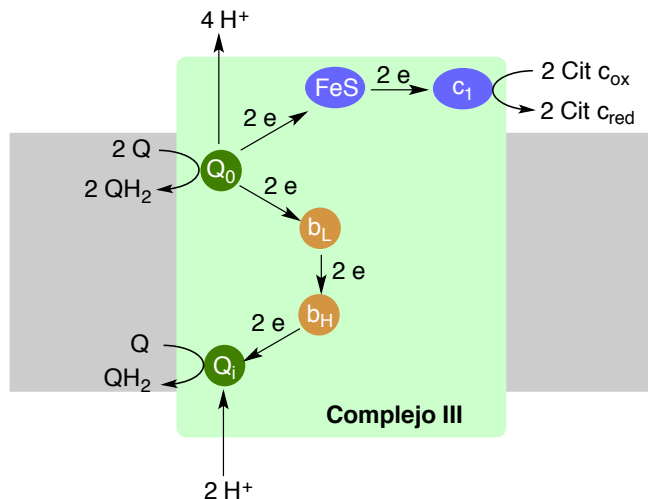
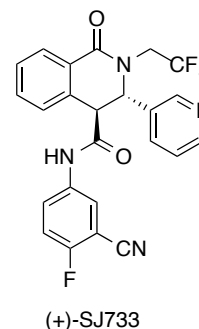


Figura 6. Reacciones químicas que tienen lugar en el complejo III. QH₂: Ubiquinol.

El estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) demostró que en los parásitos resistentes a ML238 o a BRD6323 se producía la sustitución de la guanina 98 por citosina (G98C) o por timina (G98T) en el gen que codifica PfCYTb, dando lugar al cambio de glicina por alanina (G33A) o de glicina por valina (G33V) en esta proteína. Ambas mutaciones afectan al centro de reducción de la ubiquinona (Qi), una región distinta a las mutaciones que acompañan a las resistencias anteriormente encontradas en atovacuona, decoquinato y benzoiazepina, que ocurren en el centro de oxidación (Qo) de PfCYTb (45). Ya que ni ML238 ni BRD6323 muestran resistencia cruzada con los tres antimaláricos mencionados, es de esperar que la combinación de inhibidores (o mutantes) Qo y Qi tenga efectos sinérgicos.

7.2. Antimaláricos inhibidores de PFATP4

En un cribado de alto rendimiento utilizando cocultivos de *P. falciparum* y eritrocitos, se identificaron tres series compuestas de interés. Una de ellas, la serie de dihidroisouquinolonas (DHIQs), se optimizó y caracterizó farmacológicamente, originando el candidato para ensayos clínicos (+)-SJ733. Este compuesto, que se obtiene fácilmente y con buen rendimiento, actúa sobre la ATPasa del plasmodio PfATP4 encargada de mantener bajos niveles de Na⁺ en el interior de sus células, produciendo in vitro una rápida perturbación de la homeostasis de este catión, que induce la muerte suicida de los eritrocitos infectados (eritosis) o su senescencia, e in vivo la rápida desaparición de los parásitos. El desarrollo de resistencias por mutación de PfATP4 es muy lento debido a que actúan rápidamente (46).



7.3. Antimaláricos inhibidores de aminoacil-ARNt sintetasas

Muchos antibacterianos son también antimaláricos porque los parásitos de la malaria contienen un orgánulo de origen bacteriano no fotosintético denominado apicoplasto, originado a partir de un alga por endosimbiosis secundaria (47). Dentro de las enzimas que intervienen en la biosíntesis proteica, unas de las menos explotadas son las aminoacil-ARNt sintetasas (ARS), diseñadas para reconocer a un aminoácido y al ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) compatible con él. En esencia, la traducción requiere que un determinado aminoácido se transfiera previamente al AMP y después se ligue a su correspondiente ARNt por la catálisis de la correspondiente ARS, formando un éster entre el grupo carboxilo del aminoácido y un grupo 3'-OH del RNAt. Este aminoacil-ARNtAA posee en una de sus asas un triplete de nucleótidos complementario (anticodón) que reconoce al triplete de nucleótidos (codón) del ARNm que se encuentra unido a la subunidad menor de los ribosomas. La síntesis de proteínas se inicia con la unión

de dos aminoácidos (iniciación), y continúa con la agregación de nuevos aminoácidos en un extremo de la cadena (elongación) en procesos regulados por factores del mismo nombre. Cuando el ribosoma llega al codón de terminación situado en el extremo 3' del ARNm, cesa la síntesis proteica y se liberan la proteína y los ácidos ARNm y ARNt, iniciándose de nuevo el proceso.

El estudio de inhibidores de aminoacil-ARNt sintetetas se dirigió en principio a la búsqueda de antibióticos que interfieren este proceso en los ribosomas bacterianos (48). Entre estos antibióticos encontramos al cloranfenicol, que impide las uniones peptídicas; la estreptomycin, que afecta al inicio de la traducción; la eritromicina, que bloquea la translocación del ARNm; la kirromicina, que inhibe la actividad de los factores de elongación; la

puromicina, que se enlaza al sitio A del ribosoma de modo que la cadena peptídica se liga al antibiótico y no a un aminoacil-ARNt; y las tetraciclinas, que se enlazan reversiblemente a la subunidad 30S bloqueando la unión de aminoacil-tRNA al lugar A de éstos y evitando así la introducción de nuevos aminoácidos en las cadenas peptídicas en crecimiento (Figura 7) (49). La mayoría de estos antibióticos interfiere también la síntesis proteica en los ribosomas eucarióticos, pero afectan mucho más a los bacterianos. Por ejemplo, las tetraciclinas se enlazan también a la subunidad 40S de los ribosomas de las células eucarióticas, pero éstas son menos vulnerables porque la concentración de antibiótico en su citoplasma es menor al carecer del sistema de transporte activo que poseen las bacterias.

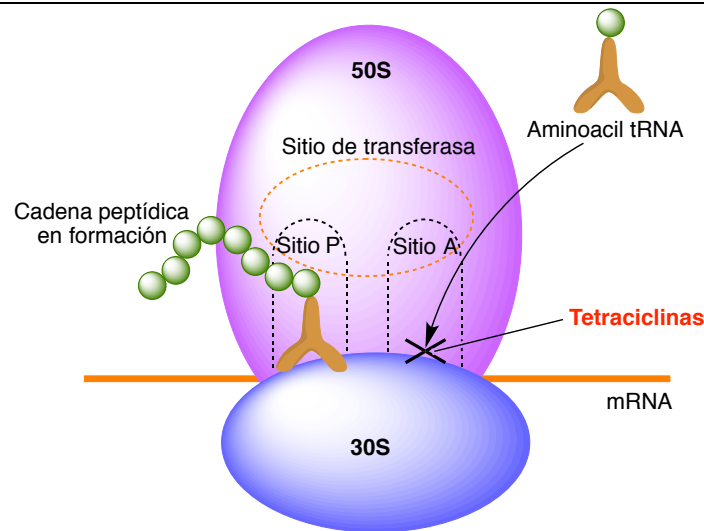


Figura 7. Mecanismo de acción de las tetraciclinas.

La búsqueda de compuestos naturales o sintéticos inhibidores específicos de aminoacil-ARNt sintetetas bacterianas ha sido intensa, aunque el único antibiótico de este tipo comercializado es mupirocina (Bactroban®), un producto natural aislado de *Pseudomonas fluorescens* que

inhibe selectivamente la enzima isoleucil-ARNt sintetasa (IleRS) bacteriana sin inhibir su homóloga humana. Esta inhibición se explica por la semejanza de una porción de la estructura de mupirocina con el grupo isoleucilo de Ile-AMP (Figura 8) (50).

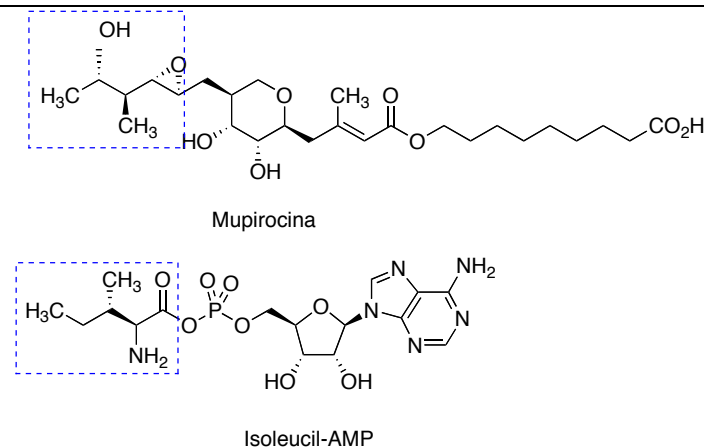


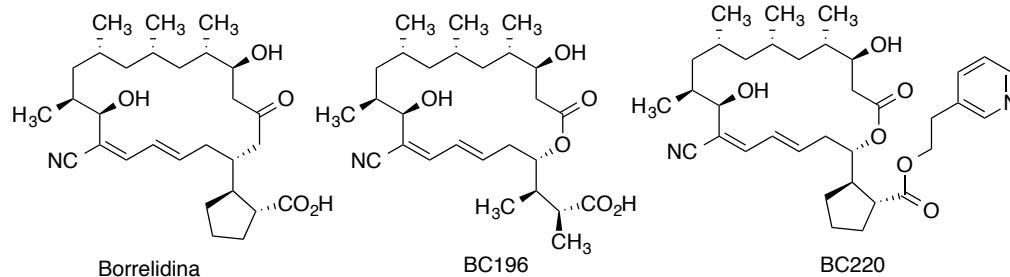
Figura 8. Porciones miméticas en mupirocina y adenilato de isoleucilo.

En los últimos años, estas enzimas se han considerado también como dianas de fármacos antimaláricos. Cribados fenotípicos han mostrado que es posible inhibirlas de

forma específica, teniendo además la ventaja de que estos compuestos actúan en las etapas hepáticas y sanguínea del parásito (51). Así, utilizando el método denominado *target*

A brief updated report on the battle against malaria

based drug discovery, la resolución de la estructura cristalina del complejo que forma la enzima de *P. falciparum* denominada tirosinil-ARNt sintetasa (PfTyrRS) con el adenilato de tirosilo propició el desarrollo de antimaláricos inhibidores de esta enzima, que sale del citoplasma de los glóbulos rojos infectados al medio extracelular cuando se produce su ruptura. Entonces, una secuencia peptídica se enlaza específicamente a los macrófagos del huésped y se internaliza, induciendo la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 y aumentando la expresión de los receptores de adherencia endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 (52). Las lisil- y las isoleucil-ARNt sintetetas se han validado como dianas



8. AGRADECIMIENTOS

La autora agradece profundamente la colaboración del Dr. J. C. Menéndez en la elaboración de las figuras

9. REFERENCIAS

1. a) Bloland PB. Drug resistance in malaria. World Health Organization. 2001. b) Bloland BP, Ringwald P, Snow RW. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. World Health Organization. 2003.
2. Donati D, Mok B, Chêne A, *et al.* Increased B Cell Survival and Preferential Activation of the Memory Compartment by a Malaria Polyclonal B Cell Activator. *J Immunol* 2006; 177: 3035-44.
3. a) Howard RJ, Barnwell JW, Rock EP, *et al.* Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27: 207-23. b) Taraschi TF, O'Donnell M, Martínez S, *et al.* Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 2003; 102: 3420-26.
4. Ghumra A, Semblat J-Ph, McIntosh RS, *et al.* Identification of residues in the C μ 4 domain of polymeric IgM essential for interaction with *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Immunol* 2008; 181: 1988-2000.
5. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 47: 1463-66.

antimaláricas (53,54). Aunque la mayoría de estos inhibidores son poco potentes y tienen poca biodisponibilidad, algunos como el macrólido borrelidina y sus análogos (que interactúan con un región próxima al cation Zn²⁺ de ThrRS) son muy potentes, pero son citotóxicos porque inhiben dicha enzima en células bacterianas y eucarióticas (55,56). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado nuevos análogos de borrelidina, como BC196 y BC220, muy potentes y con una toxicidad selectiva, que generan memoria inmunitaria en ratones y son eficaces para eliminar los parásitos responsables de la malaria *in vivo* (57).

6. Czajkowsky DM, Salanti A, Ditlev SB, *et al.* IgM, Fc μ -receptors and malarial immune evasion. *J Immunol* 2010; 184: 4597-603.
7. Hvlid L, Jensen AT. PfEMP1. A Parasite Protein Family of Key Importance in *Plasmodium falciparum* Malaria Immunity and Pathogenesis. *Adv Parasitol* 2015; 88: 51-84.
8. Patarroyo ME, Alba MP, Vargas LE, *et al.* Peptides inducing short-lived antibody responses against *Plasmodium falciparum* malaria have shorter structures and are read in a different MHC II functional register. *Biochem* 2005; 44: 6745-54.
9. a) Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, *et al.* Randomized, double-blind, Phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis* 2009; 200: 337-46. b) Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, *et al.* A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One* 2009; 4: e7611. c) Owusu-Agyei S, Ansong D, Asante K, *et al.* Randomized controlled trial of RTS,S/AS02D and RTS,S/AS01E malaria candidate vaccines given according to different schedules in Ghanaian children. *PLoS One* 2009; 4: e7302.
10. a) Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, *et al.* Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 1995; 171: 1576-85. b) Cohen J, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Vekemans J, Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine. *Hum Vacc* 2010; 6: 90-

6. c) Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, *et al.* A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *New England Journal of Medicine* 2012; 367: 2284-95.
11. Plassmeyer ML, Reiter K, Shimp RL Jr, *et al.* Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J Biol Chem* 2009; 284: 26951-63.
12. Coppi A, Pinzón-Ortiz C, Hunter Ch. The Plasmodium circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *JEM* 2005; 201: 27-33.
13. Aldrich C, Magin A, Emiliani C, *et al.* Roles of the Amino Terminal Region and Repeat Region of the *Plasmodium berghei* Circumsporozoite Protein in Parasite Infectivity. *PLoS One* 2012; 7: e32524.
14. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 33:492-503.
15. Myers KR, Truchot AT, Ward J, *et al.* A critical determinant of lipid A endotoxic activity. In: Nowotny A, Spitzer JJ, Ziegler EJ, editors. *Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions*. Amsterdam: Elsevier Sciences Publishers B V; 1990. pp. 145-56.
16. Ragupathi G, Gardner JR, Livingston PO, Gin DY. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10:463-70.
17. Chea EK, Fernández-Tejada A, Damani P, *et al.* Synthesis and Preclinical Evaluation of QS-21 Variants Leading to Simplified Vaccine Adjuvants and Mechanistic Probes. *J Am Chem Soc* 2012, 134: 13448-57.
18. Para el registro de este ensayo ver: ClinicalTrials.gov, número NCT00866619.
19. a) RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of Phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011; 365: 1863-75. b) RTS,S Clinical Trials Partnership. A Phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 2012; 367: 2284-95.
20. Foquet L, Hermsen C, van Gemert G-J, *et al.* Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Invest* 2014; 124: 140-4.
21. RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a Phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med* 2014; 11: e1001685.
22. Greenwood BM y otros muchos autores. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a Phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* 2015; S0140-6736(15)60721-8.
23. Bojang K, Milligan P, Pinder M, *et al.* Five-year safety and immunogenicity of GlaxoSmithKline's candidate malaria vaccine RTS,S/AS02 following administration to semi-immune adult men living in a malaria-endemic region of The Gambia. *Hum Vaccin* 2009; 5: 242-47.
24. WHO Initiative for vaccine research/global malaria programme joint technical expert group (JTEG) on malaria vaccines entering pivotal Phase 3 trials & beyond (established April 2009). <http://www.who.int/immunization/research/committee/s/jteg/en> (accessed April 22, 2015).
25. Keiser J, Utzinger J, Premji Z, Yamagata Y, Singer BH. Acridine Orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 643-54.
26. Spielman A, Perrone JB, Teklehaimanot A, *et al.* Malaria Diagnosis by Direct Observations of Centrifuged Samples of Blood. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 337-42.
27. Engelbrecht F, Tögel E, Beck HP. Analysis of *Plasmodium falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of msp2 genotypes and parasite-specific IgG responses. *Acta Tropica* 2000; 74: 63-71.
28. Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso MLH, Newton CRJC. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *The Lancet Infectious Diseases* 2006; 6: 582-88.
29. a) Sibley CH, Ringwald P. A database of antimalarial drug resistance. *Malar J* 2006; 5: 48-56. b) Alonso PL, Brown G, Arévalo-Herrera M, *et al.* A research agenda to underpin malaria eradication. *PLOS Med* 2011; 8: e1000406. c) Petersen I, Eastman R, Lanzar M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett* 2011; 585, 1551-62.
30. Algunos comentarios acerca de su uso y mecanismos de acción pueden encontrarse en: a) Avendaño C. La innovación farmacéutica. *Comentarios sobre tres noticias*. *Anal Real Acad Nac Farm* 2005; 71: 873-904. b) Avendaño C. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto. *Anal Real Acad Nac Farm* 2011; 77: 15-35.
31. White NJ. The Treatment of Malaria. *N Engl J Med* 1996; 335: 800-06.
32. Ver por ejemplo: Njomaer S. Is sulphadoxine-pyrimethamine (SP) still useful as the first-line antimalarial drug in Malawi or it must be quickly withdrawn from the antimalarial repertoire?. *Malawi Med J* 2007; 19: 37-38.
33. Ver por ejemplo: Winstaley P. Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 242-50.
34. Robert A, BenoitVical F, DechyCabaret O, Meunier B. From classical antimalarial drugs to new compounds

A brief updated report on the battle against malaria

- based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure Appl Chem* 2001; 73: 1173-88.
35. O'Neill PM, Barton VE, Ward, SA. The molecular mechanism of action of artemisinin. The debate continues. *Molecules* 2010; 15: 1705-21.
 36. Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, *et al.* Independent emergence of *Plasmodium falciparum* artemisinin resistance mutations in Southeast Asia. *J Infect Dis* 2015; 211: 670-79.
 37. Arley F, Witkowski B, Amaratunga Ch, *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2014; 505: 50-5.
 38. Bhattacharjee S, Stahelin RV, Speicher KD, Speicher DW, Haldar K. Endoplasmic reticulum PI3P lipid binding targets malaria proteins to the host cell. *Cell* 2012; 148: 201-12.
 39. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, *et al.* A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2015; 520: 683-7.
 40. Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009; 8: 879-91.
 41. Para una revisión de los progresos más relevantes realizados entre 2010 y 2012 ver: Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Letters* 2013; 23: 2829-43.
 42. Heidebrecht R, Mulrooney C, Austin ChP, *et al.* Diversity-Oriented Synthesis Yields a Novel Lead for Treatment of Malaria, *ACS Med Chem Lett* 2012; 3: 112-7. Ver el comentario de esta noticia en: Avendaño C. *Anal Real Acad Nac Farm* 2012; 78: 418-24.
 43. Lukens AK, Heidebrecht RW, Mulrooney C, *et al.* Diversity-Oriented Synthesis Probe Targets *Plasmodium falciparum* Cytochrome b Ubiquinone Reduction Site and Synergizes With Oxidation Site Inhibitors. *J Infect Dis* 2015; 211: 1097-103.
 44. Painter HJ, Morrisey JM, Mather MW, Vaidya AB. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2007; 446: 88-91.
 45. a) Fisher N, Meunier B. Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. *FEMS Yeast Res* 2008; 8: 183-92. b) Dong CK, Uргаonkar S, Cortese JF, *et al.* Identification and validation of tetracyclic benzothiazepines as *Plasmodium falciparum* Cytochrome bc1 Inhibitors. *Chem Biol* 2011; 18: 1602-10. c) Nam T-G, McNamara CW, Bopp S, *et al.* A chemical genomic analysis of decoquinone, a *Plasmodium falciparum* cytochrome b inhibitor. *ACS Chem Biol* 2011; 6: 1214-22.
 46. Jiménez-Díaz MB, Ebert D, Salinas Y, *et al.* (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E5455-62.
 47. Ralph SA, D'Ombra MC, McFadden GI. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 145-51.
 48. a) Kim S, Lee SW, Choi EC, Choi SY. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61:278-88. b) Pohlmann J, Brotz-Oesterheld H. New aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2004; 4: 261-72. c) Hurdle JC, O'Neill AJ, Chopra I. Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4821-33.
 49. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3675-81.
 50. Nakama T, Nureki O, Yokohama S. Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 2001; 276: 47387-93.
 51. Hoen R, Novoa EM, López A, *et al.* Selective inhibition of an apicoplastic aminoacyl-tRNA synthetase from *Plasmodium falciparum*. *ChemBioChem* 2013; 14: 499-509.
 52. Bhatt TK, Khan S, Dwivedi VP, *et al.* Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses. *Nat Commun* 2011; 2: 530. doi: 10.1038/ncomms1522.
 53. Hoepfner D, McNamara C, Lim CS, *et al.* Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host Microbe* 2012; 11: 654-63.
 54. Istvan ES, Dharía NV, Bopp SE, *et al.* Validation of isoleucine utilization targets in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 1627-32.
 55. Azcárate IG, Marín-García P, Camacho N, *et al.* Insights into the preclinical treatment of blood-stage malaria by the antibiotic borrelidin. *Br J Pharmacol* 2013; 169: 645-58.
 56. Ruan B, Bovee ML, Sacher M, *et al.* A unique hydrophobic cluster near the active site contributes to differences in borrelidin inhibition among threonyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 2005; 280:571-77.
 57. Novoa EA, Camacho N, Tor A, *et al.* Analogs of natural aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors clear malaria in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E5508-17.



Antimicrobial resistance in strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from thermal waters at Chimborazo, Ecuador

Title in Spanish: Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia del Chimborazo, Ecuador

Félix Andueza^{1, 2, 3}, Ana Albuja², Paola Arguelles², Sandra Escobar², Carlos Espinoza², Judith Araque³, Gerardo Medina^{2, 3}

¹Prometeo Senescyt, Ecuador. ²Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Ecuador. ³Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

ABSTRACT: Human intervention in the hot springs has brought its microbiological and chemical contamination. The indiscriminate use of antimicrobials, have resulted in the contamination of various aquatic environments with these substances and bacteria. The objectives were to meet antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hot springs in the region of Chimborazo, Ecuador. 12 samples of thermal water baths from Chimborazo Province were analyzed. Samples consisted of a volume of 0.5 liters of water. *Pseudomonas aeruginosa* isolation was performed by the membrane filtration technique using cellulose acetate filter 0.45 µm pore, a sample volume of 100 ml and Cetrimide agar. The isolates were identified following schemes MacFadden (2004) and Barrow and Feltham (1993), supplemented with biochemical tests of API (bioMérieux) galleries. The profile of antibiotic resistance was determined by the method of dissemination of Kirby and Bauer (1966) and the results were interpreted according to the CLSI (2014). 15 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were identified. All strains were resistant to ampicillin and ampicillin - Sulbactam antibiotics and five were multidrug resistant to six antibiotics (Ampicillin, ampicillin-Sulbactam, amikacin, ceftazidime, cefepime and ciprofloxacin). The results show us the need for studies of resistance ecosystems hot springs, to determine the presence of resistance genes in indigenous bacteria.

RESUMEN: La intervención humana en los manantiales de aguas termales ha traído su contaminación microbiológica y química. El uso indiscriminado de los antimicrobianos, han desembocado en la contaminación de diversos ambientes acuáticos con estas sustancias y con bacterias resistentes a las mismas. En este sentido el objetivo del presente trabajo fue conocer la resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la región del Chimborazo, Ecuador. Se analizaron 12 muestras de agua termal procedentes de baños de la Provincia del Chimborazo. Las muestras consistieron de un volumen de 0,5 litro de agua de cada manantial. El aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó por la técnica de filtración en membrana, utilizando filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro, un volumen de muestra de 100 ml y el agar Cetrimida. Las cepas aisladas se identificaron siguiendo los esquemas de MacFadden (2004) y Barrow y Feltham (1993), complementados con las pruebas bioquímicas de las galerías API (bioMérieux). El perfil de resistencia a los antibióticos se determinó por el método de difusión de Kirby y Bauer (1966) interpretándose según el CLSI (2014). Se identificaron 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Todas las cepas fueron resistentes a los antibióticos Ampicilina y Ampicilina-Sulbactam, y cinco fueron multiresistentes a seis antibióticos (Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Amikacina, Cef tazidime, Cefepime y Ciprofloxacina). Los resultados nos señalan la necesidad de realizar estudios del resistoma de los ecosistemas de las aguas termales, para determinar la presencia de genes de resistencias en las bacterias autóctonas.

*Corresponding Author: felixandueza@hotmail.com

Received: February 22, 2015 Accepted: July 3, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 158-163

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento desmesurado de las ciudades, aunado a la creciente intervención del hombre sobre su entorno, ha traído como consecuencia que muchas de las fuentes y manantiales naturales de agua termal se hayan contaminado, alterando de esta manera su composición

química y microbiológica.

Estudios realizados por investigadores a nivel mundial han determinado que las aguas termales no son estériles. En ellas se pueden distinguir dos grupos de bacterias con diferentes orígenes y propiedades. Un grupo puede entrar al agua como contaminante ocasional, procedente del aire,

tierra, resto de plantas y desperdicios humanos. Generalmente representa una población transitoria y no puede crecer en un sustrato con niveles de nutrientes extremadamente bajos, como lo es el agua mineral, por lo que mueren rápidamente. El otro grupo bacteriano corresponde a la llamada microbiota autóctona, consistente de bacterias mesófilas, oligocarbofilicas, tales como miembros de los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (1, 2, 3).

Varias de las especies bacterianas pertenecientes a los principales géneros encontrados en las aguas termales, han sido catalogadas como bacterias patógenas oportunistas, destacando entre ellas los miembros de los géneros *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas* y *Pseudomonas* (4, 5, 6).

El género *Pseudomonas* está constituido por bacterias de forma bacilar Gram negativas, pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*. Se aíslan de suelos, agua, plantas y animales. La epidemiología de *Pseudomonas* refleja su predilección por un medio ambiente húmedo. Dentro de este género destaca la especie *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los patógenos oportunistas más importantes implicado en las infecciones nosocomiales en todo el mundo. Es una bacteria ubicua que es capaz de sobrevivir bajo muchas condiciones, y en muchos hospitales puede crear nuevos nichos para su desarrollo. Varios de los sitios, ambientes y objetos implicados en las infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* con frecuencia son equipos médicos, aguas envasadas, productos contaminados como gotas para los ojos, soluciones desinfectantes y jabones, así como los propios trabajadores de la salud, otros pacientes contaminados, y algunas veces el paciente en sí mismo (7).

Las infecciones en humanos por *Pseudomonas aeruginosa* se asocian también con reservorios relacionados con el agua fuera de los hospitales (piscinas, bañeras, soluciones para lentes de contacto, entre otras). El número de potenciales factores de virulencia que produce el microorganismo, y el amplio espectro de enfermedades que causa, sugiere que la patogenia de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* es multifactorial. Deben asumirse múltiples mecanismos patogénicos en enfermedades tan diversas como las septicemias en pacientes neutropénicos, infecciones pulmonares crónicas, en pacientes con fibrosis quística, endocarditis en adictos a la heroína, dermatitis en personas que usan baños calientes y otitis externa en diabéticos ancianos. A pesar de que esta bacteria fue descubierta hace más de un siglo, continúa siendo tema de estudio y análisis, por la importancia clínica, por su prevalencia en infecciones nosocomiales y por la múltiple resistencia a los antibióticos (8).

El uso indiscriminado de antibióticos en las prácticas médicas, veterinarias y agrícolas resulta en la descarga hacia el ambiente y cuerpos de agua, de antibióticos y bacterias resistentes a antibióticos (9, 10, 11, 12).

Se ha señalado el aislamiento de muestras clínicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes y

multiresistentes a diversos antibióticos. Sin embargo es escasa la información de aislamiento de este tipo de bacterias en ecosistemas acuáticos como las aguas termales (13).

Diversos estudios evidencian que tanto en los ecosistemas animal, humano, terrestre como los acuáticos, existe un reservorio de genes de resistencia antimicrobiana denominado resistoma de antibióticos, cuyo papel en la diseminación y surgimiento de bacterias resistentes y multiresistentes no se ha valorado correctamente (14).

Tomando en consideración lo antes señalado, se planteó el presente trabajo de investigación cuyo objetivo principal fue determinar la resistencia a los antibióticos en bacterias de la especie *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de agua termal procedentes de la Provincia del Chimborazo, Ecuador.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Muestras

Se analizaron un total de 12 muestras de agua termal provenientes de los sitios de emergencia del agua, como de las piscinas utilizadas por los bañistas, de cada uno de los baños termales conocidos como Guayllabamba y los Elenes, ubicados en la Provincia del Chimborazo, Ecuador. De cada baño se tomaron 2 muestras de cada sitio de muestreo por un periodo de 3 semanas. Las muestras consistieron en 500 ml de agua, recolectadas en recipientes estériles. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio, lo cual se realizó dentro de las 24 horas luego de su recolección.

2.1. Métodos

2.2.1. Recuento de cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* presentes en muestras de agua mineral termal

Se utilizó la técnica de filtración en membrana, filtrando un volumen de 100 ml de muestra de agua y utilizando filtros de 0,45 μm los cuales se colocaron sobre la superficie del Agar Cetrimida y se incubaron a 37° C durante 24 horas (15, 16).

Finalizado el tiempo de incubación se cuantifico el número de colonias de *Pseudomonas* crecidas, expresándose el resultado como medias aritméticas de las unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas* por mililitro (ufc/ml).

Posteriormente, cada colonia se aisló y purificó en Agar Soja Tripticasa para su posterior identificación.

2.2.2. Identificaciones taxonómicas de las colonias de *Pseudomonas* aisladas

Las colonias aisladas y purificadas del género *Pseudomonas* se identificaron por medio de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, de acuerdo a los esquemas de identificación bacteriana señalados por MacFadden (2004), (17). Las pruebas bioquímicas y fisiológicas aplicadas se realizaron según lo

indicado por Barrow y Feltham (1993), (18) y complementadas con las pruebas bioquímicas contenidas en las galerías de identificación bacteriana API 20 NE (bioMeriaux).

Las cepas bacterianas aisladas se clasificaron siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (19) y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB) y publicadas en el *International Journal of Systematic Bacteriology*.

2.2.3. Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas

Se utilizó el método de difusión en agar de acuerdo a la técnica Kirby y Bauer, (20). Se tomaron 200 µl de una suspensión de bacterias equivalente al McFarland 0,5 y se mezclaron con 100 ml de agar antibiótico. Se depositaron 25 ml en cuatro placas de Petri estériles y una vez solidificado se colocaron sobre su superficie discos de ceftazidime (CF, 30µg), ampicilina (AMP, 10µg), ampicilina-Sulbactam (AMP-S, 10 µg), amikacina (AMI, 15µg), cefepime (CE, 30µg), vancomicina (VAN, 30 µg) y ciprofloxacina (CIP, 5µg). La selección de antibióticos se realizó de acuerdo a lo recomendado por el CLSI (21) y en base a la disponibilidad de las casas comerciales

Se incubaron durante 48 horas a 37°C. Una vez finalizada la incubación se llevó a cabo la lectura e interpretación de los resultados. Se utilizó como cepas de control, cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La prueba se interpretó de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (21).

3. RESULTADOS

Se estudiaron las aguas termales de los baños Guayllabamba y los Elenes, ubicados en la Provincia del Chimborazo, Ecuador. Las aguas de estos manantiales se caracterizan por presentar una temperatura promedio en sus puntos de emergencia de 40° C y una temperatura promedio ambiental de 12°C. Desde el punto de vista de su composición química, serían aguas clasificadas como sulfatadas magnésicas (22).

De las 12 muestras de agua termal examinada, tanto de los sitios de emergencia como de las piscinas, se logró detectar la presencia de colonias de la especie *Pseudomonas aeruginosa* con un contaje promedio de 4 UFC/100 ml en los puntos de emergencia del agua, y de 7 UFC/100 ml en las piscinas.

De las muestras donde se detectó el crecimiento de colonias bacterianas, se aislaron e identificaron 20 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, de las cuales 15 resultaron pertenecer a la especie *Pseudomonas aeruginosa* y 5 a otras especies de *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas putida* (1 cepa) y *Pseudomonas stutzeri* (4 cepas).

De las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* identificadas, 6 se aislaron de los puntos de emergencia y 9 de las piscinas.

Todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas e identificadas resultaron sensibles a la vancomicina y resistentes a los antibióticos Ampicilina y Ampicilina-Sulbactam, y 5 cepas, que corresponde al 33,33 % del total aisladas, fueron multiresistentes a seis antibióticos diferentes: Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Amikacina, Ceftazidime, Cefepime y Ciprofloxacina (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de resistencia a diversos antibióticos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en muestras de aguas termales pertenecientes a la Provincia del Chimborazo, Ecuador.

Cepa <i>P. aeruginosa</i>	CF (30µg)	AMP (10µg)	AMP-S (10 µg)	VAN (30 µg)	AMI (15µg)	CE (30µg)	CIP (5µg)
1 PE	S	R	R	S	S	S	S
2 PE	S	R	R	S	S	S	S
3 PE	R	R	R	S	R	R	R
4 PE	S	R	R	S	S	S	S
5 PE	S	R	R	S	S	S	S
6 PE	S	R	R	S	S	S	S
7 PIS	R	R	R	S	R	R	R
8 PIS	S	R	R	S	S	S	S
9 PIS	R	R	R	S	R	R	R
10 PIS	R	R	R	S	R	R	R
11 PIS	S	R	R	S	S	S	S
12 PIS	S	R	R	S	S	S	S
13 PIS	S	R	R	S	S	S	S
14 PIS	S	R	R	S	S	S	S
15 PIS	R	R	R	S	R	R	R
Referencia	S	R	R	S	S	S	S

Nota: CF= ceftazidime; AMP= ampicilina; AMP-S= ampicilina-Sulbactam; VAN= vancomicina; AMI= amikacina; CE= cefepime; CIP= ciprofloxacina R= resistente; S= sensible; PE= Punto de Emergencia del agua; PIS= Piscina

4. DISCUSIÓN

La presencia de cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas minerales naturales, como lo son las aguas termales, es un fenómeno muy común en este tipo de ecosistema acuático, donde esta especie bacteriana, gracias a su amplia capacidad metabólica puede sobrevivir y desarrollarse, así como cumplir diversas funciones dentro de estos sistemas acuáticos, tales como moduladores de los ciclos de los principales elementos químicos, formación de biofilms y depurador de la contaminación química y biológica (3, 7, 23, 24).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, respecto a la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, son similares a los señalados por otros investigadores para el agua de manantiales termales de diferentes partes del mundo (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Rosenberg y Hernández-Duquino (1989), señalan la experiencia de un laboratorio en Alemania en donde en un periodo de 3 años (1985-1988) lograron aislar *Pseudomonas aeruginosa* en un 10 % de las muestras estudiadas (33). De igual forma Richards y col. (1992), reportan el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en un 4 % de las muestras de agua mineral examinadas en un estudio llevado a cabo en Inglaterra (34).

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el agua termal, puede reflejar una contaminación muy importante en las mismas. La explicación del hecho pudiera estar en una contaminación de la fuente o manantial de agua mineral, falta de protección adecuada del acuífero que surge del agua, la presencia de biofilms en las paredes o piedras donde sale el agua, aguas de escorrentía o debido a la descarga de desechos de origen animal o humano en los manantiales termales (23, 24, 25).

Por otra parte, la presencia de bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas termales, trae consigo el problema de que se debe considerar la resistencia a los antimicrobianos, ya que esta es una de las bacterias que en las últimas décadas ha demostrado una gran capacidad para transmitir y dispersar muchos de los genes responsables de estas características (35).

Diversos autores han demostrado la presencia de cepas bacterianas resistentes y multiresistentes a los antibióticos en las aguas minerales, destacando entre ellas los miembros del género *Pseudomonas* (36, 37, 38) lo que es de gran interés desde el punto de vista de la epidemiología, y sobre todo de la salud pública, dado a que las aguas minerales son utilizadas en su mayoría por personas enfermas o con su sistema inmunológico comprometidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en relación a la presencia de resistencia y multiresistencia a los antibióticos de uso para combatir las infecciones producidas por esta especie bacteriana, son similares a los resultados que han obtenido otros autores en aguas minerales en diferentes partes del mundo (13, 33, 36, 37, 39, 40).

El rápido incremento de la resistencia a los antibióticos en las comunidades bacterianas es un fenómeno ecológico,

pero también es un fenómeno biológico, genético, epidemiológico y social (38).

Se ha postulado que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es el resultado del uso indiscriminado de estas sustancias, que ejercen presión selectiva, promoviendo la supervivencia de bacterias mejor dotadas para evitar su efecto letal (41).

En un trabajo realizado en Italia por Messi y col., en el año 2005, sobre la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en aguas minerales, se señala que el 55 % de las cepas multiresistentes aisladas correspondían a cepas del género *Pseudomonas* (36). Resultados parecidos a los obtenidos en el presente trabajo y que reflejan el papel que juega el género *Pseudomonas* en la dispersión y diseminación de los factores genéticos responsables de la resistencia a diversos antibióticos.

Ullah y col., en el año 2012, en una investigación realizada en Pakistán, donde se estudió la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y sus perfiles de resistencia antimicrobiana en aguas minerales, señala la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a una gran diversidad de antibióticos con una alta prevalencia de cepas multiresistentes (42), muy similar a los resultados obtenidos en el presente estudio donde casi la mitad de las cepas obtenidas presentan multiresistencia a 6 antibióticos de los mismo grupos químicos analizados en ambos trabajos.

Los análisis de secuencias de los genes de resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico, han revelado una estrecha relación con las especies de *Pseudomonas* de origen ambiental, lo que lleva a pensar en el importante papel del medio ambiente en la diseminación de los genes responsables de estas características (42, 43).

Estudios realizados en los últimos años evidencian que en casi todos los ecosistemas, incluidos los de los medios acuáticos, existe un reservorio de genes de resistencia en la población de microorganismos autóctonos, que se ha denominado resistoma de antibióticos que es capaz de comunicarse y diseminar estos genes entre las bacterias de distintos tipos de ecosistema incluido el humano (14).

Los resultados obtenidos en relación a los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentes en el agua termal, muestran que este tipo de agua puede ser un reservorio importante de los genes de resistencia a diversos antibióticos y que se deben aplicar medidas de vigilancia epidemiológicas tanto en los manantiales fuentes de esta agua, como en las piscinas empleadas en cada baño.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de los ecosistemas acuáticos como resistoma de antibióticos y un medio intermediario en la diseminación y dispersión de genes de resistencias antimicrobiana y de bacterias patógenas resistentes y multiresistentes a diversos antibióticos, mostrando la necesidad de realizar estudio microbiológicos y epidemiológicos permanentes sobre las aguas minerales

termales, para evitar la posibilidad de brotes epidémicos, tanto en grupos poblacionales con mayor sensibilidad a las infecciones como lo son niños, ancianos, pacientes inmunosuprimidos o en estado de convalecencia, como en la población en general, así como la dispersión de cepas multiresistentes dentro de la población que utiliza los balnearios de aguas termales para mejorar su salud.

6. AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Senescyt, Ecuador por la beca otorgada para realizar esta investigación, y a la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo Ecuador (ESPOCH) a través de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias, así como a la Universidad de los Andes Venezuela (ULA), a través del Laboratorio de Microbiología del agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y el CDCHTA (Proyecto FA-432-A. Año 2009) por la ayuda aportada en insumos y recursos humanos para poder llevar a buen término la investigación planteada.

7. REFERENCIAS

- Schmidt-Lorenz W. Microbiological characteristics of natural mineral waters. *Ann Ist Super Sanita*. 1976; 12: 93-112.
- Quevedo-Sarmiento J, Ramos-Cormenzana A, González-López J. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjarón (Spain). *J Appl Bacteriol*. 1986; 61: 365-372.
- De la Rosa MC, Mosso MA. *Diversidad microbiana de las aguas minerales termales*. En: Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales de España, Ed. A. López y J.L. Pínuaga. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid. España. 2000; pp. 153-158
- Leoni E, Zanetti F, Cristino S, Legnani P. Monitoring and control of opportunistic bacteria in spa water used for aerosol hydrotherapy. *Ann Ig*. 2005; 17: 377-384.
- Rosas I. *Microbiología ambiental*. Instituto Nacional de Ecología. Mexico D.F. Mexico. 2004.
- Kayser F, Bienz K, Eckert J. *Medical microbiology*. Edit. Thieme. USA. 2011. pp. 1-356
- Ramos J, Filloux A. *Pseudomonas*. Vol.6. Edit. Springer. London UK. 2010; pp. 1-687
- Hauser A, Rello J. *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. Springer-Verlag GMBH. Berlin, Alemania. 2003; pp. 1-263
- Arias C, Murray B. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-A clinical super challenge. *N Engl J Med*. 2009; 360 (5): 439-443.
- Al-Ghazzi M, Jazrawi S, Al-Doori. Antibiotics resistance among pollution indicator bacteria isolated from Al-Khair River, Baghdad. *Wat Res*. 1988; 2: 641-4.
- Andersen J, Sandaa R. Distribution of tetracycline resistance determinants among Gram negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 908-12.
- Andersson D, Levin B. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Op Microbiol*. 1999; 2: 489-93.
- Tirodimos I, Arvanitidou M, Dardavessis L, Bisiklis A, Alexiov-Daniil S. Prevalence and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from swimming pools in northern Greece *East Mediterr Health J*. 2010; 16: 783-787.
- Dante G, Sommer M. Genética de la resistencia microbiana. *Investigación y Ciencias*. 2014; Agosto: 28-34.
- American Public Health Association (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. APHA. Edition 21. Washington. USA. 2005
- International Organization for Standardization (ISO). *Water quality. Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Membrane filtration method*. 16266:2006, International. Geneva. 2006.
- MacFaddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Tercera edición. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 2004; pp. 1-850
- Barrow G, Feltham RKA. *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*. Ed. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 1993
- Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. II. Springer. New York. USA. 2005
- Bauer A, Kirby W, Sherry J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45:493-496
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S24*. Twenty fourth informational supplement. 2014.
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). *Aguas termo minerales del Ecuador*. INAMHI. Quito. Ecuador. 2013, pp
- Freya E. *Cooperative behavior in Pseudomonas aeruginosa: Ecology, evolution and pathology*. University of Oxford. Uk. 207; pp. 1-223
- Botzenhart K, Doring G. *Ecology and epidemiology of Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen*. Springer. USA. 1993; pp. 1-18
- Andueza F. *Diversidad microbiana de las aguas mineromedicinales de los baños de Jaraba. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España*. 2007
- Pereira S. *Pseudomonas aeruginosa em ambiente termal: prevalencia e determinantes de patogenicidade. Tesis de Doutorado. Faculdade de farmacia, Universidad de Coimbra. Portugal*. 2014.

27. Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral natural water: a 5 year study. *Int J Food Microbiol.* 1999; 32: 153-15
28. Mosso MA, Sánchez M, de la Rosa, MC. Microbiología del agua mineromedicinal de los balnearios de Alhama de Granada. *An R Acad Nac Farm.* 2002; 68: 381-405.
29. Moore J, Heaney N, Millar B, Crowe M, Elborn J. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health.* 2002; 5: 23-26.
30. Tiago I, Chung AP, Veríssimo A. Bacterial diversity in a non-saline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl Environ Microbiol.* 2004 ; 70: 7378-7387.
31. De la Rosa MC, Andueza F, Sanchez MC, Rodriguez MC, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *An R Acad Nac Farm.* 2004; 70: 521-542.
32. De la Rosa MC, Sanchez MC, Rodriguez MC, Mosso MA. Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario. Puente Viesgo. *An R Acad Nac Farm.* 2007; 73: 251-265.
33. Rosenberg F, Hernandez-Duquino H. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from German mineral waters. *Tox Ass* 1989; 4: 281-294.
34. Richards J, Stokely D, Hipgrave P. Quality of drinking water. *BMJ.* 1992; 304: 571
35. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology.* 2009; 58: 1133-1148
36. Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Sci Total Environ.* 2005; 346: 213-219.
37. Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, Manaia CM. (2012). Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Res.* 2012; 46(11):3612-3622
38. Baquero F, Martinez J, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology.* 2008; 19 (3): 260-265.
39. Hernandez-Duquino, Rosenberg F. Antibiotic resistant *Pseudomonas* in mineral water. *Canadian Journal of Microbiology.* 1987; 33: 286-289.
40. Macerata U, Levre E, Armani G, Agostini G., Molinari G., Caroli G. Bacterial species detected in some bottled mineral waters sold in Italy. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1988; 8: 31-37.
41. Alonso A, Sanchez P, Martinez J. Environmental selection of antibiotic resistance genes, *Environ Microbiol.* 2001; 3: 1-9.
42. Ullah A, Durrani R, Ali G, Ahmed S. Prevalence of antimicrobial resistant *Pseudomonas aeruginosa* in fresh water spring contaminated with domestic sewage. *Journal of Biological and Food Science Research.* 2012; 1 (2): 19-22
43. Eckmanns T, Oppert M, Martin M, Amorosa R, Zuschneid I, Frei U, Rüden H, Weist K. (2008). An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14 (5): 454-458.



Antioxidant and cytoprotective potentials of Parmeliaceae lichens and identification of active compounds

Title in Spanish: *Potencial antioxidante y citoprotector de líquenes parmeliáceos e identificación de compuestos activos*

Carlos Fernández-Moriano¹, Pradeep Kumar Divakar², Ana Crespo² and M. Pilar Gómez-Serranillos^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain. ²Department of Plant Biology II, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.

ABSTRACT: Lichens, symbiotic organisms with special features, are able to synthesize exclusive secondary metabolites that are attracting increasing interest in their pharmacological activities. Present study aimed to perform an initial screening of the antioxidant capacities of 29 lichens from Parmeliaceae family, and the cytoprotective potential of the most promising species in a model of central nervous system-like cells. Also, another goal was to determine the main chemical constituents of the promising lichens. After molecular identification of all lichen specimens by PCR techniques regarding the molecular marker ITS rDNA, antioxidant activity was measured in terms of free radical scavenging properties through ORAC assay. Methanol extracts of the three species with highest ORAC values (*Cetrelia braunsiana* (Cb), *Parmotrema saccatilobum* (Ps) and *Usnea ghattensis* (Ug)) were analyzed for phytochemical characterization through TLC and HPLC methods. We identified alectoronic acid as major metabolite in Cb, protocetraric acid in Ps and usnic, stictic and constictic acids in Ug. Concerning cytoprotective properties, their extracts were tested on human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Protection against H₂O₂-induced oxidative stress in such neuron-like model was assessed by cell viability assays, thus determining their optimal concentrations. Then, their effect on oxidative stress markers, such as intracellular ROS formation, glutathione levels and caspase-3 activity, were evaluated. In general, lichens extracts were able to reverse the oxidative damage caused by H₂O₂, and promoted neurons survival. Results obtained in this study imply that these lichen species might be used as promising sources for natural compounds with potential neuroprotective activity, suggesting future research avenues.

RESUMEN: Los líquenes son organismos simbióticos de especiales características capaces de sintetizar metabolitos secundarios únicos, con un creciente interés por sus propiedades farmacológicas. El presente estudio persiguió realizar un cribado de la actividad antioxidante de 29 especies líquénicas de la familia Parmeliaceae, y el potencial citoprotector de los más interesantes en un modelo neuronal. Otro objetivo consistió en determinar los principales constituyentes de dichas especies. Tras la identificación molecular de todos los especímenes por técnicas de PCR, la actividad antioxidante se evaluó por la capacidad captadora de radicales libres en el ensayo ORAC. Se analizaron por TLC y HPLC los extractos metanólicos de las tres especies con mayor valor ORAC (*Cetrelia braunsiana* (Cb), *Parmotrema saccatilobum* (Ps) and *Usnea ghattensis* (Ug)) y se identificaron como principales metabolitos el ácido alectorónico en Cb, el ácido protocetrárico en Ps y los ácidos úsnico, estictico y constictico en Ug. Estos tres extractos se probaron en células de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y). Se testó la citoprotección contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ mediante ensayos de viabilidad celular, estableciendo las concentraciones óptimas. Posteriormente, se valoraron sus efectos en marcadores de estrés oxidativo, como la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno, los niveles de glutatión y la actividad de la enzima caspasa-3. En general, los extractos líquénicos revirtieron el daño oxidativo causado por H₂O₂, promoviendo la supervivencia neuronal. Los resultados obtenidos de este estudio apuntan que las especies estudiadas pueden ser prometedoras fuentes de productos naturales con potencial actividad neuroprotectora, sugiriendo futuras líneas de investigación.

*Corresponding Author: pserra@ucm.es

Received: Mars 26, 2015 Accepted: July 6, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 2 (2015), pp. 164-178

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

A lichen is a composite organism consisting of a stable, ecologically obligate, selfsupporting symbiosis between an exhabitant fungus (the mycobiont) and one or more extracellular located inhabitant, the photoautotrophic partner (the photobiont: alga or cyanobacterium) (1). They

present special characteristics; for instance, the morphology, physiology and biochemistry of lichens are very different from those of the isolated fungus and alga in culture. Lichens produce a great variety of secondary metabolites, being most of them unique to lichen-forming fungi. These lichen substances are mostly produced by the

mycobiont within the symbiosis, and they normally are compounds with a relatively low molecular weight and chemical diversity (aliphatic and aromatic) that accumulate in the cortex (such as atranorin and usnic acid) or in the medulla of the lichen thallus (such as protocetraric and physodic acids) as extracellular crystals (2, 3). Concerning pharmacological properties, lichens constitute a poorly known group of natural products in comparison to others (such as vascular plants and fungus); however, over the past 2 decades, there has been a renewed and growing interest in lichens as a source of novel pharmacologically active biomolecules (4).

Parmeliaceae (Ascomycota, Lecanorales) is the most numerous and widespread family among lichenized fungi, comprising more than 2700 species grouped in about 80 genera; in addition, it is probably the most interesting family from a pharmacological point of view (5). For instance, the representative lichen *Usnea ghattensis* have displayed in previous investigations interesting antimicrobial properties together with a promising antioxidant potential, as evidenced by chemical tests in vitro (6, 7). Similarly, Bugni et al. demonstrated the presence of active anti-inflammatory constituents in the lichen *Parmotrema saccatilobum* (8).

The lichen forming fungal family Parmeliaceae, and fungi in general, exhibit few taxonomically useful characters, many of which are homoplasious. The interpretation of morphological features is sometimes difficult to evaluate, and accurate identification of lichenized fungal species remains challenging (9, 10). In many cases, characters used for species identification may be subtle to discern, and diagnostic morphological and chemical characters could be lacking in juvenile or fragmentary samples. The traditional phenotype-based approach to species recognition in Parmeliaceae has been

shown in some cases to substantially misrepresent diversity (11, 12).

In view of the previous information, and considering the existence of few studies on intracellular ROS (reactive oxygen species) modulation by lichen extracts and metabolites (13), none focused on their role as preventive compounds in nervous system-like cells under oxidative stress conditions, we carry out the present work. The aim of the study deals with the evaluation for the first time of the in vitro neuroprotective potential, based on antioxidative effects, displayed by the methanol extract of Parmeliaceae lichens; for that purpose, we initially perform an initial screening of antioxidant capacity of various molecularly identified lichen specimens. In addition, we aim to identify the main constituents of the most promising lichens.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Reagents

Cell culture products were obtained from Gibco (Grand Island, NY) and all other chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.2. Lichen samples

The 29 lichen sample used in the present study were collected in different countries and continents, authenticated by expert lichenologists (P.K. Divakar y A. Crespo) and deposited in the Herbarium of the Faculty of Pharmacy (MAF), University Complutense of Madrid, with the identifying data presented in Table 1. Lichenic material was examined at morphological level with a binocular loupe Nikon SMZ800. For microscopic observations, an Olympus DP11 microscope was used.

Table 1. The 19 species of Parmeliaceae lichens used in the study, together with the location of their recollection and MAF codes.

Lichen specie	Origin	MAF code
<i>Bulbothrix meizospora</i> (Zahlbr.)	India, W. Himalaya, Dugebilta Mahhu Valley	MAF-LICH 16929
<i>Cetraria aculeata</i> (Schreb.)	Spain, Canary Islands, Gran Canarias, Valleseco	MAF-LICH 16927
<i>Cetraria canadensis</i> (Muell.Arg.)	USA, California	MAF-LICH 15621
<i>Cetraria nigricans</i> (Muell.Arg.)	India, North sikkim, Chubuk	MAF-LICH 16940
<i>Cetrelia braunsiana</i> (Muell.Arg.)	India, W. Himalaya, Kuachula Khark	MAF-LICH 16943
<i>Cetrelia cetrarioides</i> (Muell.Arg.)	India, North sikkim, Chubuk	MAF-LICH 16941
<i>Cetrelia olivatorum</i> (Muell.Arg.)	India, North sikkim, Yumthang	MAF-LICH 16942
<i>Evernia prunastri</i> (L.Ach.)	England, New Forest	MAF-LICH 16930
<i>Flavoparmelia citrinescens</i> (L.Ach.)	Argentina, Rio Negro, Missuti	MAF-LICH 16946
<i>Flavoparmelia euplecta</i> (L.Ach.)	Australia, New South Wales	MAF-LICH 15375

Flavoparmelia haysonii (L.Ach.)	Australia, capital territory	MAF-LICH 7535
Flavoparmelia rutidota (L.Ach.)	USA, California	MAF-LICH 16949
Hipotrachyna execta (Schaer.)	India, W. Himalaya, Kuachula Khark	MAF-LICH 15518
Lichen specie	Origin	MAF code
Myelochroa entotheiochroa (Nyl.)	Japan, Honshu, Prov. Kai, Nishizawa Valley	MAF-LICH 16937
Myelochroa irrugans (Nyl.)	Japan, Honshu, Prov. Kai, Nishizawa Valley	MAF-LICH 16931
Parmelia saxatilis (Nyl.)	England, New Forest	MAF-LICH 16932
Parmotrema abessinicum (Krempelh.)	Kenya, Rift Valley, lake Naivasha	MAF-LICH 16938
Hipotrachyna execta (Schaer.)	India, W. Himalaya, Kuachula Khark	MAF-LICH 15518
Parmotrema austrosinense (Zahlbr.)	Japan, Honshu, Prov Hitachi, Tsukuba	MAF-LICH 16934
Parmotrema perlatum (Nyl.)	England, New Forest	MAF-LICH 16938
Parmotrema praeserediosum (Nyl.)	Brazil, Pernambuco, Catimbau National Park	MAF-LICH 16945
Parmotrema reticulatum (Taylor)	Japan, Honshu, Prov. Musashi, Chichibu	MAF-LICH 16935
Parmotrema saccatilobum (Taylor)	Japan, Honshu, Prov. Kai, Nishizawa Valley	MAF-LICH 16928
Usnea arizonica (Mot.)	USA, California	MAF-LICH 16947
Usnea aurantiacoatra (Mot.)	Chile, Ambarino	MAF-LICH 15686
Usnea contexta (Mot.)	Chile, Ambarino	MAF-LICH 15710
Usnea filipendula (Zahlbr.)	USA, California	MAF-LICH 16948
Usnea ghattensis (Zahlbr.)	India, Tamil Nadu, Ghat, Nilgiri Hills	MAF-LICH 16944
Usnea sp. (Mot.)	Japan, Honshu, Prov. Musashi, Saitama	MAF-LICH 16936
Xantoparmelia coreana (Gyeln.)	Japan, Honshu, Prov. Hitachi, Tsukuba	MAF-LICH 16933

2.3. Molecular identification

Total genomic DNA was extracted from freshly collected material and/or herbarium specimens younger than 5 years. To reduce contamination by fungal endophytes, samples were carefully prepared and visible symptoms of secondary fungal growth were removed. Small pieces (ca. 2 mm²) were carefully separated, washed in acetone for two hours to remove potential secondary metabolites and dried overnight. Samples were ground with sterile pestles into liquid nitrogen and later into the lysis buffer at 65 °C, incubated at 65 °C for two hours and later kept at room temperature overnight. DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) according to the manufacturer's instructions but with slight modifications (14).

PCR amplifications of the ITS gene fragment was performed using fungal specific primers ITS1-LM (15)

and ITS2-KL (16). Genomic DNA (1–10 ng) was used for PCR amplifications of the ITS regions. The 25 µL PCR reactions contained buffer 1x (containing 10 mM Tris pH 9.0, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100), 0.2 mM each dNTP, 0.5 µM each primer, 1.25 units Taq DNA polymerase (Applied Biosystems) and 1–10 ng genomic DNA extract. PCR amplifications were carried out in a Techne R TC-3000 thermal cycler under the following conditions: initial heating step of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 54°C and 1.5 min at 72°C. A final extension step of 5 min at 72°C was added, after which the samples were kept at 4°C. Amplification products were viewed on a 1% agarose gel stained with SYBR Safe DNA (Life Technologies Corporations, Grand Island, New York, U.S.A.), and purification was performed by adding 2 µL of ExoSAP-IT™ (Exonuclease 1-Shrimp Alkaline Phosphatase) to 10 µL of PCR products, followed by a heat treatment of 15 min at 37°C and 15 min at 80°C. Both complementary

strands were sequenced using the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) with the same primers used in the amplification step and with following settings: initial denaturation at 94°C for 3 min; 25 cycles at 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, 60°C for 4 min.. Sequencing reactions were electrophoresed on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) at the Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid).

Sequence fragments generated for this study were assembled and edited using the program SeqMan v.7 (Lasergene R, DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA). The sequences were blasted against GenBank database following the methodology outlined in Sayers et al. (17) to approach the samples identity. The arbitrary $\geq 97\%$ threshold value for assigning specimens to a closely related congeneric species-group was selected as criterion for assessing successful species identification.

2.4. Preparation of lichen extracts

Methanol extract of the 29 lichen specimens were prepared by using 1 mL of methanol per mg of lichen thallus. They were maintained for 1 hour in a sonicator (Branson) and then filtered. After evaporation of methanol at room temperature, dry extracts were kept at 4°C in the fridge and later re-dissolved in methanol or PBS for the following experiments.

2.5. Evaluation of antioxidant activity

The Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) assay was carried out as previously described (18). Dilutions of samples and Trolox (reference antioxidant, water soluble vitamin E analogue) were incubated in opaque 96-wells plates for 10 min at 37°C with fluorescein. After this period, the azocompound AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride) was added to the mixture. Fluorescence is read every 56 seconds for 98 minutes using a FLUOstar Optima fluorimeter (BMG Labtech) (λ_{exc} 485nm and λ_{em} 520 nm). Area under the curve (AUC) was calculated for each sample and compared with AUC of Trolox. ORAC values are expressed as μ mol Trolox equivalents (TE)/mg samples.

2.6. Cytoprotective activities

2.6.a. Neurons cultures and treatments

Neurons from SH-SY5Y (human neuroblastoma) cell line were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 0.5% gentamicin in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 37°C. H₂O₂ was used as oxidative stress inductor, at a concentration of 0.1 mM for 30 min. Cells were treated with lichen extracts at different concentrations for 24 h. Extracts and H₂O₂ were dissolved in PBS for corresponding dilutions.

2.6.b. Assessment of cell viability (MTT assay)

Mitochondrial integrity and activity, as cell viability indicators, were determined by using MTT assay (19) with

minor variations. Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well in 96-well plates overnight and then treated with different concentrations of lichens extracts (ranging from 0.5 to 250 μ g/mL) for 24 h. Finally, MTT (2 mg/mL) was added and plates were incubated for 1 h at 37°C. After removing medium, DMSO was added in order to dissolve the dark blue formazan crystals. Absorbance was then measured at 550 nm using a microplate reader Digiscan 340 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

2.6.c. Protection against H₂O₂- induced toxicity

For evaluating a possible protective effect against oxidative stress inductors, cells were exposed to 0.1 mM H₂O₂ for 30 min after treatments with the extract (20), and MTT assay was later conducted as previously described.

2.6.d. Intracellular ROS production assay

ROS production was assayed using the DCFH-DA method (21), with some modifications. In brief, after cellular treatments, 50 μ L DCFH-DA/25 mL PBS-glucose was loaded for 30 min. After this time of incubation at 37°C, cells were washed twice with PBS- glucose. ROS generation was examined for 2 h (λ_{exc} 480 nm and λ_{em} 510 nm) in a Microplate Fluorescence Reader FLx800 (Bio-Tek, Instrumentation, USA).

2.6.e. Determination of caspase-3 activity

Inhibition of H₂O₂-mediated apoptosis by extracts was assessed through the caspase-3 activity, by measuring the cleavage of a fluorogenic substrate (22). After treatments, 100 μ L of cell lysates were collected and added in a 96-well plate. Well volume was completed with 50 μ L reaction buffer (20 mM HEPES, 10% glycerol, 2 mM DTT, pH of 7.5) and 2 μ L of caspase-3 substrate solution (1 mg/mL in DMSO) in the end. Substrate cleavage was measured fluorometrically every hour using a FLx800 (λ_{exc} 360/40 nm and λ_{em} 480/20 nm).

2.6.f. Glutathione levels

GSH and GSSG levels determination was performed according to the method described by Hissin and Hilf (23). Reaction mixture for the determination of GSH contained 50 μ L of the lichen sample, 150 μ L of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) and 20 μ L of o-phthalaldehyde (1 mg/mL in methanol); instead, reaction mixture for estimating of GSSG contained 50 μ L of the sample and 3 μ L of N-ethylmaleimide and was maintained for 5 min in darkness in this point before adding 150 μ L of 0.1 N NaOH (pH 12) and 20 μ L of o-phthalaldehyde solution. Finally, both preparations were incubated for 15 min at room temperature in the dark, and fluorescence was measured at λ_{exc} 528 nm and λ_{em} 485 nm with a microplate fluorescence reader. Ratio GSH/GSSG was obtained by dividing the nmols per mg of protein of GSH and GSSG.

2.7. Phytochemical analysis

2.7.a. Thin Layer Chromatography (TLC)

TLC analyses were performed based on Culberson methods (24-26). Methanol extracts of lichen thallus were charged on the silicagel plate and run with a mobile phase composed of toluene/acetic acid (85:15). Once the plate had been saturated with the solvent within a glass cuvette, the plate was removed and dried at room temperature. It was then exposed and observed under UV light and revealed by spreading a sulfuric acid solution along the plate, which was placed on a heater.

2.7.b. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC analysis was performed in a SPECTRA-PHYSICS SP 8800/8810LC coupled to a UV-vis detector, measuring at a wavelength of 254nm. The column employed was a C18 Mediterranean Sea (150 x 4.6 mm, 5 µm particle size; Teknokroma) and the mobile phase consisted of A (acetonitrile / methanol (20:80 v/v)) and B (4 % acetic acid solution). Elution was performed isocratically at a flow of 1 mL/min and at room temperature. Reference chromatograms were used from

lichens with known composition (*Neofuscelia glabrans*, *N. parviloba*, *Xanthoparmelia exemplaris*) and analyzed in the same conditions (27).

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as means ± SD of at least three independent experiments. Statistical differences were tested using one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons, using the Statgraphics Centurion XVI software. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Identification of lichen species

For the molecular identification of the lichen specimens, fragments of ITS rDNA sequences obtained were analyzed through BLAST function of NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank database (04 March 2015), thus attributing to a certain sequence a percentage of overlapping with the most similar by comparative analysis (see Table 2).

Table 2. Genbank code assigned to the 29 lichen species after comparison with the most similar appearing in BLAST.

Lichen specie	Genbank Code
<i>Bulbothrix meizospora</i>	EF 092102
<i>Cetraria aculeata</i>	EU 409758
<i>Cetraria canadensis</i>	GU 994635
<i>Cetraria nigricans</i>	AF 494383
<i>Cetrelia braunsiana</i>	GU 994636
<i>Cetrelia cetrarioides</i>	AF 254630
<i>Cetrelia olivatorum</i>	GU 994638
<i>Evernia prunastri</i>	DQ 923634
<i>Flavoparmelia citrinescens</i>	GU 994641
<i>Flavoparmelia euplecta</i>	HM 010928
<i>Flavoparmelia haysonii</i>	HM 014233
<i>Flavoparmelia rutidota</i>	DQ 084148
<i>Hipotrachyna execta</i>	GQ 919258
<i>Myelochroa entotheiochroa</i>	EF 042917
<i>Myelochroa irrugans</i>	EF 092128
<i>Parmelia saxatilis</i>	AF 391137
<i>Parmotrema abessinicum</i>	HM 017025
<i>Parmotrema austrosinense</i>	DQ 912360
<i>Parmotrema perlatum</i>	AY 586580
<i>Parmotrema praeserediosum</i>	DQ 912316
<i>Parmotrema reticulatum</i>	DQ 084184
<i>Parmotrema saccatilobum</i>	AB 627399
<i>Usnea arizonica</i>	AF 297732
<i>Usnea aurantiacoatra</i>	EF 179798
<i>Usnea contexta</i>	AJ 249573
<i>Usnea filipendula</i>	FR 799076
<i>Usnea ghattensis</i>	EF 179806
<i>Usnea sp. (Mot.)</i>	JF 794062
<i>Xanthoparmelia coreana</i>	AF 262010

3.2. Evaluation of antioxidant activity

The chemoluminescence induced by the peroxy radical generation, initiated by AAPH in ORAC assay, decreased following the addition of several lichen extracts. As shown in Table 3, there was a vast variation in ORAC values of the 29 lichen species studied; the higher the ORAC value, the better antioxidant activity. Some lichen

extracts exerted negligible antioxidant activity, such as *Cetraria aculeata* and *Cetrelia nigricans*, whereas other species demonstrated higher potential for scavenging peroxy radicals, such as *Cetrelia braunsiana* (3.21 $\mu\text{mol TE/mg}$ sample), *Parmotrema saccatilobum* (4.38 $\mu\text{mol TE/mg}$ sample) and *Usnea ghattensis* (4.74 $\mu\text{mol TE/mg}$ sample).

Table 3. ORAC values in $\mu\text{mol TE/mg}$ sample (expressed as Mean \pm SD) obtained for the 29 species.

Samples	ORAC values
<i>Bulbothrix mezospora</i>	1.14 \pm 0.11
<i>Cetrelia braunsiana</i>	3.21 \pm 0.17
<i>Cetrelia cetrarioides</i>	0.13 \pm 0.02
<i>Cetrelia nigricans</i>	0.03 \pm 0.01
<i>Cetrelia olivatorum</i>	1.00 \pm 0.04
<i>Cetraria aculeata</i>	0.01 \pm 0.01
<i>Cetraria canadensis</i>	2.52 \pm 0.17
<i>Evernia prunastri</i>	2.21 \pm 0.19
<i>Flavoparmelia citrinescens</i>	0.24 \pm 0.02
<i>Flavoparmelia euplecta</i>	0.62 \pm 0.09
<i>Flavoparmelia haysomii</i>	1.40 \pm 0.05
<i>Flavoparmelia rutidota</i>	0.15 \pm 0.02
<i>Hipotrachyna execta</i>	1.67 \pm 0.07
<i>Myelochroa entothiochroa</i>	0.60 \pm 0.04
<i>Myelochroa irrugans</i>	0.52 \pm 0.01
<i>Parmelia saxathis</i>	1.22 \pm 0.23
<i>Parmotrema abessicum</i>	0.48 \pm 0.24
<i>Parmotrema austrosinense</i>	0.46 \pm 0.18
<i>Parmotrema perlatum</i>	0.25 \pm 0.10
<i>Parmotrema praeserediosum</i>	0.23 \pm 0.02
<i>Parmotrema reticulatum</i>	0.07 \pm 0.02
<i>Parmotrema saccatilobum</i>	4.38 \pm 0.18
<i>Usnea arizonica</i>	0.50 \pm 0.04
<i>Usnea aurantiacoatra</i>	0.25 \pm 0.02
<i>Usnea contexta</i>	0.20 \pm 0.04
<i>Usnea filipendula</i>	1.67 \pm 0.04
<i>Usnea ghattensis</i>	4.74 \pm 0.09
<i>Usnea sp</i>	1.83 \pm 0.05
<i>Xantoparmelia coreana</i>	0.71 \pm 0.08

At this point, we selected the three species showing higher antioxidant activity in ORAC assay (as highlighted above) for the following experiments.

3.3. Cytoprotective activities

3.3.a. Assessment of cell viability and protection against H₂O₂- induced cell death

Nine different concentrations ranging from 0.25 to 100 $\mu\text{g/ml}$ were tested for each extract in order to determine the effects of single extracts in the viability of SH-SY5Y cells through the MTT assay. Results obtained for the effects of Cb, Ps and Ug are shown in Figure 2, and expressed as the percentage of cell viability, considering the optical density of untreated control cells as 100% (triton X-100 5% was used as a negative control). A significant cell viability loss was observed for Cb from 25

$\mu\text{g/ml}$ and higher concentrations; however, from 10 $\mu\text{g/ml}$ of Ps and Ug cell viability appeared diminished.

Therefore, the concentrations of the extracts that compromised cell viability were discarded, and five/six concentrations of each extract were chosen for assessing their protection against oxidative stress and cellular toxicity exerted by hydrogen peroxide. H₂O₂ decreased cell viability to approximately 55% of control, but Cb 0.25-0.5 $\mu\text{g/mL}$, Ps 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and Ug 0.25-0.5 $\mu\text{g/mL}$ significantly reversed that effect and protected neurons viability. The concentrations displaying highest protection against H₂O₂ were then chosen for each extract (0.5 $\mu\text{g/ml}$ for Cb and Ug and 0.25 $\mu\text{g/mL}$ for Ps) and assayed in the following experiments.

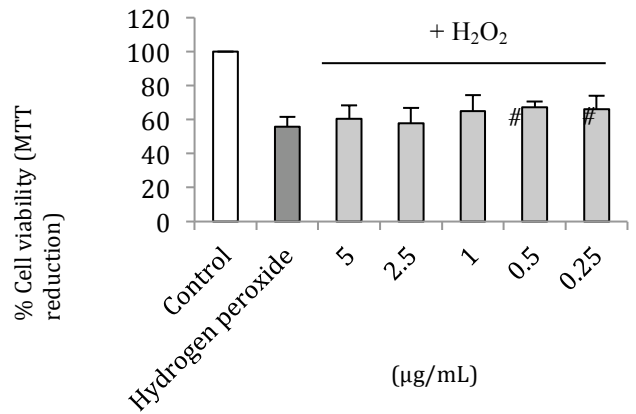
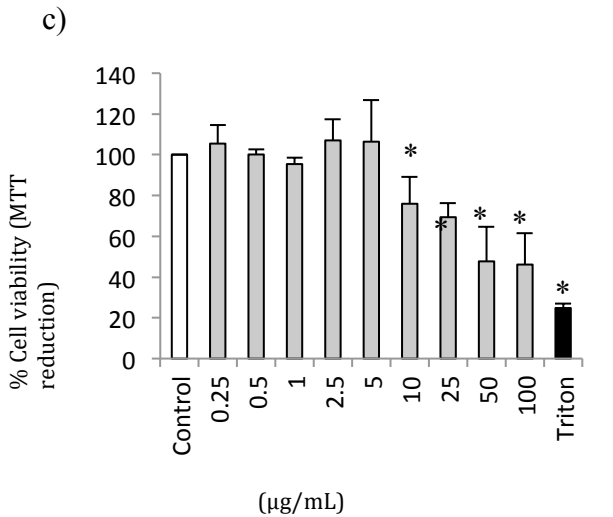
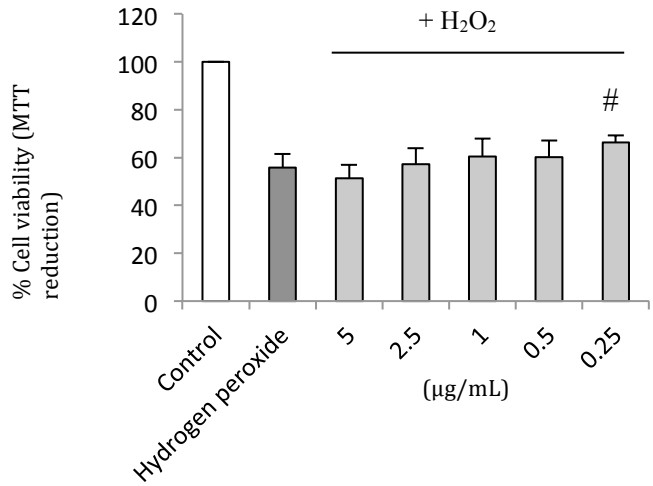
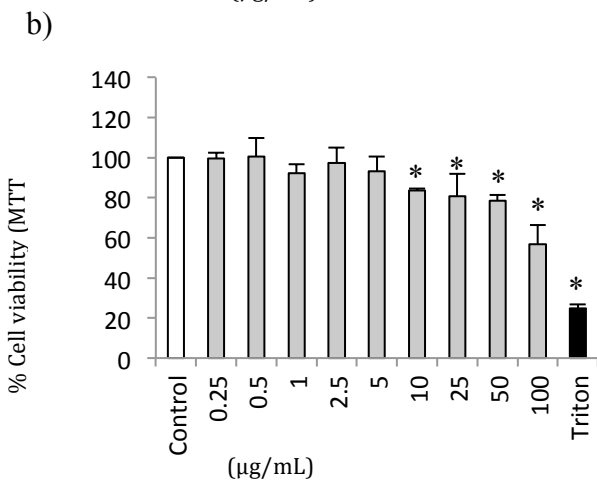
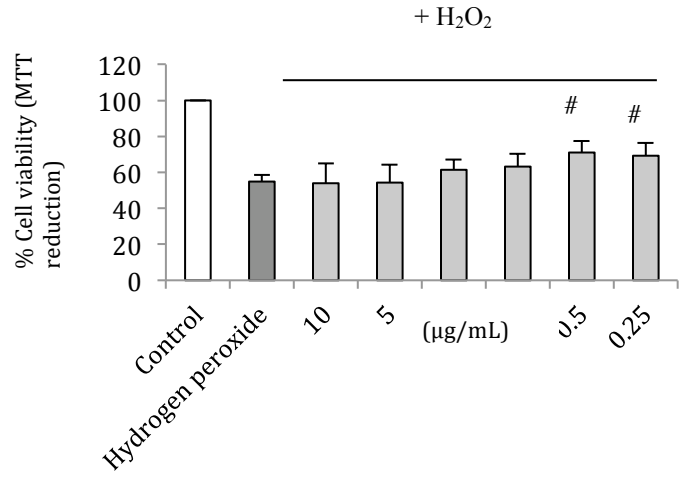
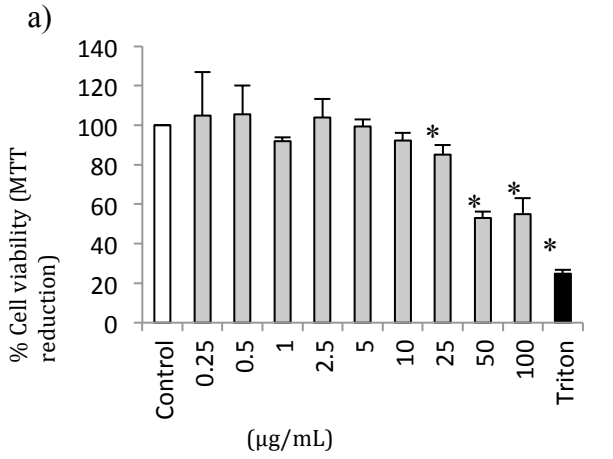


Figure 2. Effects of extracts *Cb* (a), *Ps* (b) and *Ug* (c) on the cell viability of SH-SY5Y cells evaluated by MTT assay. Initially, cells were treated only with the extracts in a range of concentrations from 0.25 to 100 µg/ml (24 h) (graphics on the left) and certain concentrations were later tested for protection against H₂O₂ (0.1 mM, 30 min) (graphics on the right). Means ± SD, *p < 0.05 Vs control; # p < 0.05 Vs H₂O₂.

3.3.b. Intracellular ROS production assay

Figure 3 shows that SH-SY5Y cells exposed to H₂O₂ presented intracellular ROS levels significantly increased to approximately 20% in comparison to control cells (100% ROS generation) throughout the experiment. Moreover, none of the lichen extracts caused by

themselves remarkable intracellular ROS production when compared to control cells (data not shown). However, pretreatments with the chosen concentrations of the three extracts displayed a significant inhibitory activity against H₂O₂- induced ROS production within the neuron-like cells.

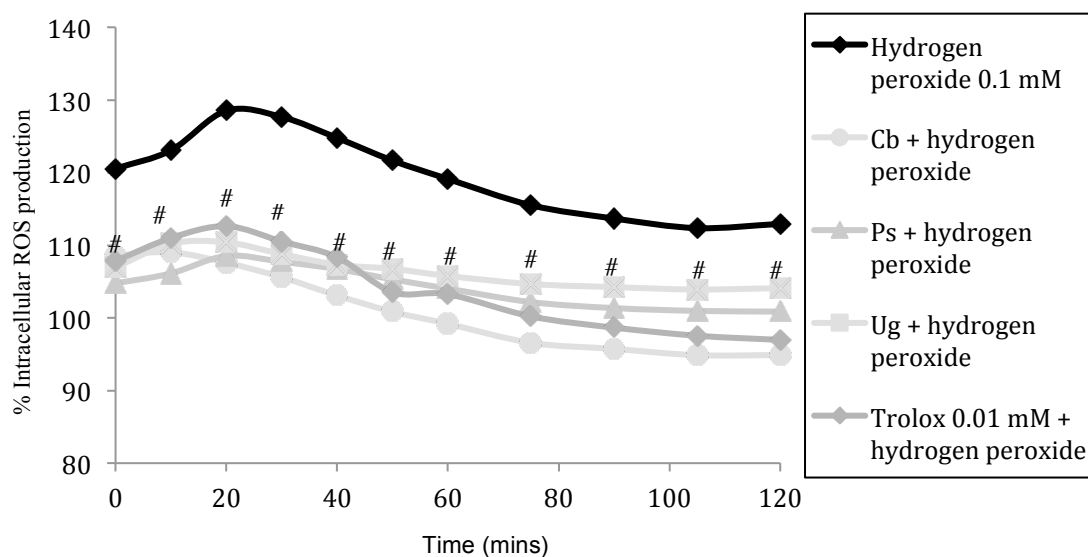


Figure 3. Effects of pretreatments with *Cb*, *Ps*, *Ug* and trolox on H₂O₂- induced ROS generation in SH-SY5Y cells (concentrations: 0.5 µg/mL for *Cb* and *Ug* and 0.25 µg/mL for *Ps*). Mean values, # p < 0.05 Vs H₂O₂, and affects all points below.

3.3.c. Determination of caspase-3 activity

We evaluated the potential inhibitory activity of lichen extracts on caspase-3 activity by a fluorimetric method. As shown in Figure 4, exposition of SH-SY5Y cells to H₂O₂ resulted in a remarkable increase by over 270 % of caspase-3 activity compared to control cells. Pretreatments with *Cb* and *Ug* were able to significantly reverse this

elevation, almost to basal levels. However, *Ps* pretreatment could not diminish the induced caspase-3 up-regulation. With these results, protective effects of *Cetrelia braunsiana* and *Usnea ghattensis* extracts might be partially attributed to an inhibition of apoptosis, but not in the case of *Parmotrema saccatilobum*.

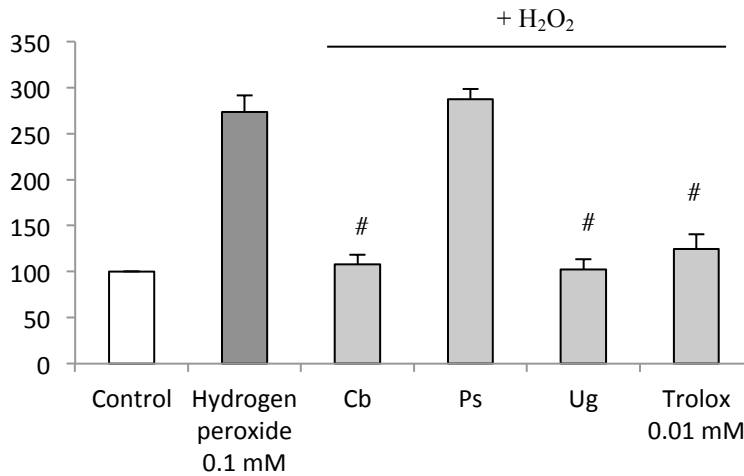


Figure 4. Effects of pretreatments with *Cb*, *Ps*, *Ug* and trolox on H₂O₂-induced caspase-3 over-activation (concentrations: 0.5 µg/mL for *Cb* and *Ug* and 0.25 µg/mL for *Ps*; 24 h). Cells were treated with lichen extracts and H₂O₂ (0.1mM; 30 mins). Means ± SD, # p < 0.05 Vs H₂O₂.

3.3.d. Gluthatione levels

GSH and GSSG levels were measured as important oxidative stress markers by using fluorometric methods. It was evidenced that glutathione is mostly found as its reduced form in control cells and, when SH-SY5Y cells were incubated with H₂O₂ (0.1 mM for 30 min), GSH levels decreased significantly (7.77 nmol/mg protein) when compared with control cells (9.47 nmol/mg protein), while the levels of the oxidized form also increased significantly (2.62 nmol/ mg protein for control cells and 9.05 nmol/mg protein for cells treated only with H₂O₂). On

the other hand, pretreatments with the three lichen extracts, at the concentrations previously mentioned for each one, ameliorated antioxidant capacity in neurons by increasing GSH/GSSG ratio compared to cells treated only with H₂O₂. Methanol extract of *Usnea ghattensis* was the most effective in restoring normal GSH and GSSG levels against the oxidative damage induced by H₂O₂ and the only one showing a statistically significant difference. Results obtained for all extracts and trolox (as reference antioxidant) are expressed in Figure 5.

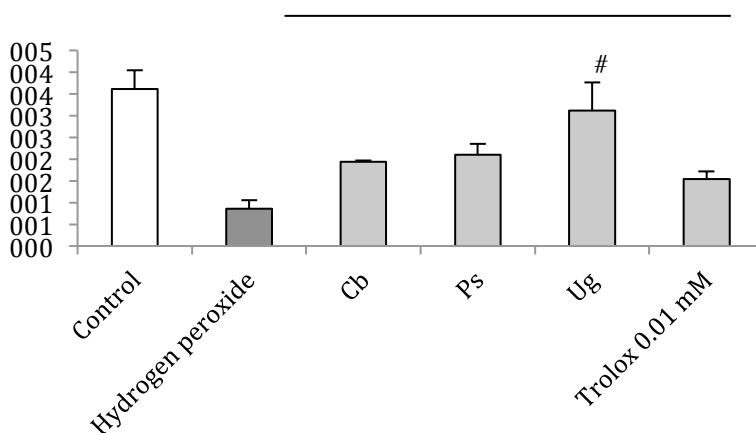


Figure 5. Effects of pretreatments with *Cb*, *Ps*, *Ug* and trolox on H₂O₂-induced changes in GSH/GSSG ratio (concentrations: 0.5 µg/mL for *Cb* and *Ug* and 0.25 µg/mL for *Ps*; 24 h). Cells were treated with lichen extracts and H₂O₂ (1mM). Means ± SD, # p < 0.05 Vs H₂O₂.

3.4. Phytochemical analysis

In view of the results of ORAC and cytoprotective assays, we carried out a phytochemical analysis for the extracts of the three species under study (*Cetrelia braunsiana*, *Parmotrema saccatilobum* and *Usnea ghattensis*) with the purpose to correlate the antioxidant potential with their chemical composition.

Identification of the different components was done based on the Rf values (ratio between the distance run by the compound and by the eluent) and their comparison with those values present in scientific bibliography (28). Table 4 collects the data obtained through TLC analyses with the compounds identified for each lichen specie.

Table 4. Chemical composition determined through TLC analyses for the methanol extracts of *Cetrelia braunsiana* (Cb), *Parmotrema saccatilobum* (Ps) and *Usnea ghattensis* (Ug).

Compound	Rf	Cb	Ps	Ug
Usnic acid	0.71	-	-	+
Stictic acid	0.18	-	-	+
Constictic acid	0.20	-	-	+
Alectoronic acid	0.17	+	-	-
Atranorin	0.79	+	+	-
Protocetraric acid	0.50	-	+	-
Salazinic acid	0.40	-	-	-
Evernic acid	0.43	-	-	-

On the other hand, we performed a reverse phase HPLC analysis of the methanol extracts in order to deepen on phytochemical characterization, since it is a more sensitive and specific method. Chromatograms obtained for the three species under study were evaluated by comparing the retention times (t_R) of their main peaks to the chromatograms of the standards, analyzed under the same experimental conditions. For that purpose, *Neofuscelia glabrans* (containing alectoronic acid), *Neofuscelia parviloba* (with usnic acid) and *Xanthoparmelia exemplaris* (with protocetraric acid) were used as references. Through the HPLC method, we identified the following compounds: alectoronic acid (9.21 ± 0.20 min) in *Cetrelia braunsiana*, protocetraric acid (4.90 ± 0.11 min) in *Parmotrema saccatilobum*, and usnic acid

(17.40 ± 0.23 min) in *Usnea ghattensis*. Results of retention times are expressed as mean value of three different analyses, and chromatograms obtained for the three species are collected in Figure 1.

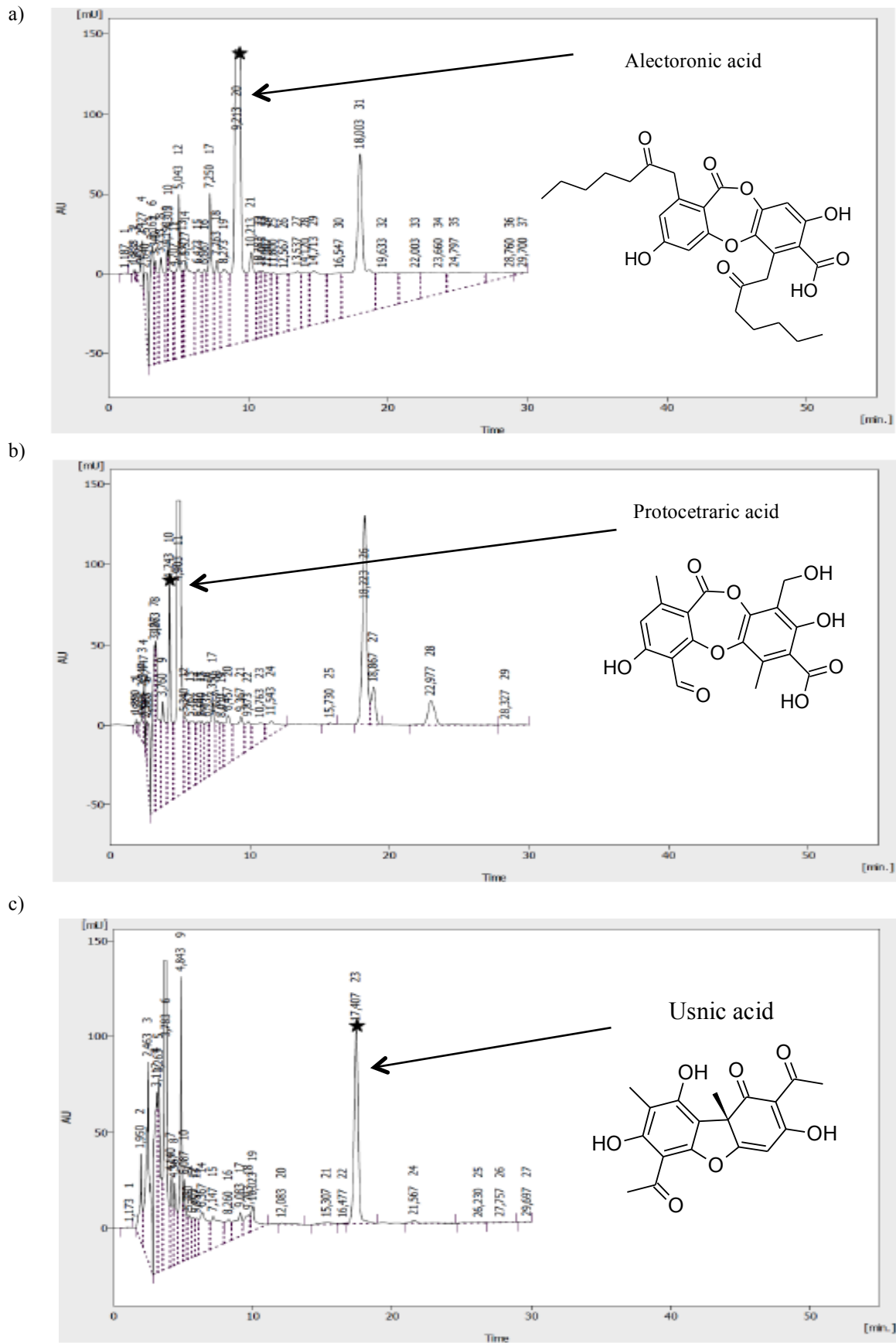


Figure 1. Chromatograms acquired at 254 nm for the metanol extracts of *Cetrelia braunsiana* (a), *Parmotrema saccatilobum* (b) and *Usnea ghattensis* (c).

4. DISCUSSION

In the lack of taxonomically significant morphological features especially at lower taxonomic level, molecular-based techniques have provided a valuable additional tool for species identification (29). The internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal RNA (ITS rRNA) is the most frequently sequenced fungal genetic marker, including lichenized fungi, and this locus has been recently accepted as universal DNA barcode marker for fungi (30).

The use of DNA barcoding as a major tool for identification of fungal species largely depends on the development of high-quality sequence databases that are thoroughly curated by taxonomists. A reference DNA sequence database generated from expertly identified specimens of well-circumscribed taxa may provide an effective alternative to phenotype-based identification of species by using DNA barcoding (31). In a recent study, a huge number of fungal ITS sequences especially type species lodged in Genbank have been well-created by taxonomists (32). The National Institute of Health's (NIH) genetic sequence database, GenBank, currently provides the largest number of ITS sequences from lichen-forming fungi, especially Parmeliaceae representing a broad range of taxonomic and geographic diversity (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). This could provide a valuable resource for species identification through BLAST-based sequence similarity searches of DNA sequence data obtained from unidentified samples.

Considering all these points, we selected the ITS marker for our research in order to acquire correct species identification and applied BLAST-based sequence similarity searches approach to identify the 29 samples under study.

Once a Genbank code had been assigned for each lichen specimen, we proceeded to evaluate the antioxidant activity through the ORAC assay. We obtained a varied range of ORAC values for the different species, what may be related to the differences in chemical composition among lichen genus and species. Among in vitro antioxidant tests, ORAC assay is classified as a hydrogen atom transfer (HAT)-based assay and, therefore, such donation of a hydrogen atom might be a plausible mechanism for explaining the antiradical properties exerted by the compounds present in the methanol extracts (33). At this point, we selected the three species with the highest ORAC values: *Cetrelia braunsiana*, *Parmotrema saccatilobum* and *Usnea ghattensis*.

Their methanol extracts were tested on a cellular model of neurons threatened by the hydrogen peroxide-induced oxidative stress; the final aim was to assess the cytoprotective properties of these lichens in nervous system-like cells, since no previous studies had dealt with the issue. Cell viability studies allowed the selection of the optimal concentration for each extract that was further used in other experiments measuring some markers of oxidative stress such as intracellular ROS levels, caspase-3

activity and concentrations of the endogenous antioxidant glutathione.

The incidence of exogenous H₂O₂ on intracellular ROS levels was evaluated by DCFH-DA fluorimetric assay. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA) is a non-fluorescent compound that is able to cross cell membranes and is de-acylated by intracellular esterases, turning into 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH); DCFH, in presence of ROS like hydrogen peroxide, reacts with them and oxidizes to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), which is already a high fluorescent compound. Intracellular fluorescence of DCF allows to quantify intracellular ROS formation and oxidative stress, since its intensity is proportional to the amount of ROS produced. Results obtained in this assay confirm that H₂O₂, under established experimental conditions, exerts induction of oxidative stress and increase intracellular ROS levels (34). The decrease in ROS generation mediated by the pretreatment with lichen extracts might suggest that oxidative stress reduction as an important mechanism underlying their cytoprotective action.

Consistence evidences demonstrate a direct relationship between cellular oxidative stress and apoptosis (35). Apoptosis is a complex process of programmed cell death in which mitochondria play a crucial role, and involves several molecular pathways including caspases activation; inhibition of apoptosis arises as a plausible mechanism for neuroprotection (36). Caspase-3 is a key enzymatic mediator in external and internal apoptosis pathways, and suppression of active caspase-3 contributes to the cellular protection against oxidative stress (37). Through a fluorimetric method, we demonstrated that caspase-3 activity was enhanced after H₂O₂ treatment, but that *Cb* and *Ug* were able to reverse such effect. Therefore, the attenuation of neuronal apoptosis may also mediate their neuroprotective effects.

Glutathione in its reduced state (GSH) is the major endogenous antioxidant in the body due to the presence of a reactive cysteine moiety. The ratio between the oxidized-type (GSSG) and reduced-type glutathione levels is often used as indicative of the cellular reducing power. As a result of a decrease in GSH levels or because of changes in GSH/GSSG ratio, cells experience greater oxidative damage (38). The measurement of the concentrations of GSH and GSSG in the different group of cells evidenced that *Ug* favors a good antioxidant status within the neurons; a pretreatment with this lichen extracts protected cells from GSH depletion induced by oxidative stress, thus promoting cell survival.

Results on chemical composition of the three species obtained by a TLC method have been confirmed through HPLC, and are in agreement with previous studies on the phytochemistry of these species (39-41). A plausible correlation between the main constituents and their potential pharmacological activities might be established. Hence, antioxidant activities exerted by methanol extracts of *Cetrelia braunsiana* (*Cb*) and *Parmotrema saccatilobum*

(*Ps*) are probably due to the presence of alectronic acid and protocetraric acid, respectively; both extracts contain atranorin as another secondary metabolite in an importance proportion, so atranorin should also be taken into consideration when dealing with pharmacological properties. Regarding *Usnea ghattensis* methanol extract (*Ug*), usnic acid is present in similar concentration than other compounds belonging to the stictic acid complex (consictic and stictic acid), and those metabolites could also contribute to the biological activities; then, antioxidant capacity should not be only attributed to usnic acid in this specie.

5. CONCLUSIONS

Methanol extracts of *Cetrelia braunsiana*, *Parmotrema saccatilobum* and *Usnea ghattensis* have been investigated for the first time regarding their neuroprotective activities, via antioxidant actions, in a model of oxidative stress in nervous system-like cells (neuron model); for such purpose, the human astrocytoma SH-SY5Y cell line was chosen due to its extensive use as cellular model in neuroprotection experiments, in both physiological and pathological conditions (42-44).

Present study was initiated with a molecular identification of 29 lichen species collected worldwide and belonging to Parmeliaceae family. After preparation of methanol extracts from all specimens, antioxidant capacity was evaluated through ORAC assay, since antioxidation is a considered mechanism for neuroprotection. Several extracts demonstrated interesting radical scavenging actions in that assay, and the three afore-mentioned species with higher potentials were chosen for cytoprotective experiments on cellular substrate.

Through the MTT assay, optimal concentrations for each extract (0.5 µg/mL for *Cb* and *Ug*, and 0.25 µg/mL for *Ps*) were selected in view of their cytoprotective results against H₂O₂, and then tested in the experiments measuring oxidative stress markers. In general, our results indicate that these Parmeliaceae lichens are able to reverse H₂O₂-induced negative effects on redox status in neurons. *Usnea ghattensis* appears to display the best protective activity, since its extract was able to significantly decrease intracellular ROS formation, attenuate changes in glutathione system and decrease caspase-3 activity.

Concerning the active constituents in the lichens, chemical composition was defined in order to identify the major compounds in each extract. By TLC and HPLC, two largely used methods in lichens phytochemistry (45), we determined that the main constituents present in the three extracts were alectronic acid (*Cb*), protocetraric acid (*Ps*), and usnic and stictic acids (*Ug*). All these secondary metabolites are biosynthesized through the polyketide pathway and belong to the group of structures called depsidones, except usnic acid which is a dibenzofuran compound. They might be responsible for the pharmacological properties demonstrated in the present work, and therefore, they are worthy of further investigation.

Finally, it can be stated that tested lichen species display promising neuroprotective properties, based on their antioxidative effects, in nervous system cellular model of excessive oxidative stress. Results suggest that the three species could be an interesting source of natural products with neuroprotective interest; deeper investigations may focus on the study of effects of isolated metabolites in other *in vitro* and *in vivo* models of neurodegeneration.

6. CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests.

7. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a doctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (FPU), awarded to Carlos Fernandez Moriano (N° FPU12/03824).

8. REFERENCIAS

- Hawksworth DL, Honegger R. The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. In: Ed. Williams MA, Plant Galls. The Systematics Association, Special Vol. 49. Clarendon Press, Oxford. 1994: pp. 77-98.
- Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 1999; 86: 559-570.
- Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch C* 2010; 65: 157-173.
- Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm Biol* 2012; 50:778-798.
- Gómez-Serranillos MP, Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Divakar PK, Crespo A. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *RSC Adv* 2014; 4: 59017-59047.
- Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis in vitro*, *Biotechnol Lett* 2005; 27: 991-995.
- Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytother Res* 2005; 19: 58-64.
- Bugni TS, Andjelic CD, Pole AR, Rai P, Ireland CM, Barrows LR. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*. 2009; 80: 270-273.
- Crespo A, Lumbsch HT. Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus* 2010; 1: 167-170.
- Crespo A, Divakar PK, Hawksworth DL. Generic concepts in parmelioid lichens, and the phylogenetic value of characters used in their circumscription. *Lichenologist* 2011; 43: 511-535.
- Divakar PK, Figueras G, Hladun N, Crespo A. Molecular phylogenetic studies reveal an undescribed species within the North American concept of

- Melanelixia glabra* (Parmeliaceae). Fungal Divers 2010; 42: 47-55.
12. Leavitt SD, Esslinger, TL, Spribille T, Divakar PK, Lumbsch HT. Multilocus phylogeny of the lichen-forming fungal genus *Melanohalea* (Parmeliaceae, Ascomycota): Insights on diversity, distributions, and a comparison of species tree and concatenated topologies. Mol Phylogenet Evol 2013; 66: 138-152.
 13. Paudel B, Bhattarai HD, Koh HY, *et al.* Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen Ramalina terebrata. Phytomedicine 2011; 18: 1285-1290.
 14. Crespo A, Divakar PK, Blanco O, Schroeter B. The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilizing generic concepts in the parmelioid lichens. Taxon 2001; 50: 807-819.
 15. Myllys L, Lohtander K, Källersjö M, Tehler A. Sequence insertions and ITS data provide congruent information on *Roccella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) Phylogeny. Mol Phylogenet Evol 1999; 12: 295-309.
 16. Lohtander K, Myllys L, Sundin R, Källersjö M, Tehler A. The species pair concept in the lichen *Dendrographa leucophaea* (Arthoniales): Analyses based on ITS sequences. Bryologist 1998; 101: 404-411.
 17. Sayers WE, Barrett T, Benson DA *et al.* Data resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res 2011; 39: D38-D51.
 18. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. J Agric Food Chem 2004; 52: 48-54.
 19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.
 20. González-Burgos E, Duarte AI, Carretero ME, Moreira PI, Gómez-Serranillos MP. Mitochondrial-targeted protective properties of isolated diterpenoids from *Sideritis* spp. in response to the deleterious changes induced by H₂O₂. J Nat Prod 2013; 76: 933-938.
 21. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2,7-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 1992; 5: 227-231.
 22. Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. J Neurosci Res 1998; 52: 334-341.
 23. Hissin P, Hilf RA. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem 1976; 74: 214-226.
 24. Culbertson CF. A standardized method for the identification of lichen products. J Chromatography 1970; 46: 85-89.
 25. Culbertson CF. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. J Chromatography 1972; 72: 113-115.
 26. Culbertson CF. Conditions for the use of Merck silica gel 60 F254 plates in the standardized thin-layer technique for the lichen products. J Chromatography 1974; 97: 107-108.
 27. Cansaran D, Atakol O, Halici MG, Akay A. HPLC analysis of usnic acid in some extracts of the lichen *Parmelia* and investigation of their constituent. Pharm Biol 2007; 45: 77-81.
 28. Orchard AA. Flora of Australia. Lichens-Lecanorales2, Parmeliaceae. Various authors (Eds). Australian Biological Resources Study. CSIRO Publishing. 1994: Vol 55.
 29. Divakar PK, Crespo A. Molecular phylogenetic and phylogenomic approaches in studies of lichen systematics and evolution. In: Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpal R (Eds.). Recent advances in lichenology: modern methods and approaches in lichen systematics and culture techniques. Springer, New Delhi (IN), 2015: Vol. 2, pp. 45-60.
 30. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109: 6241-6246.
 31. Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 97: 99-108.
 32. Schoch CL, Robbertse B, Robert V, *et al.* Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database (Oxford) 2014; 2014:bau061.
 33. Apak R, Güçlü K, Demirata B, *et al.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 2007; 12: 1496-1547.
 34. González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Nrf2-dependent neuroprotective activity of diterpenoids isolated from *Sideritis* spp. J Ethnopharmacol 2013; 147: 645-552.
 35. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. Arch Toxicol 2013; 87:1157-1180.
 36. Perez-Pinzon MA, Stetler RA, Fiskum G. Novel mitochondrial targets for neuroprotection. J Cereb Blood Flow Metab 2012; 32: 1362-1376.
 37. Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. Brain Pathol. 2000; 10: 283-92.
 38. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Nat. Rev Neurosci 2004; 5: S18-S25.
 39. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Experimental studies on the growth and usnic acid production in "lichen" *Usnea ghattensis* *in vitro*. Microbiol Res 2006; 161: 232-237.

40. Luo H, Wei XL, Han KS, Koh YJ, Hur JS. Taxonomic study on the lichen genus *cetrelia* (lecanorales, ascomycota) in South Korea. *Mycobiology* 2007; 35: 117-123.
41. Joshi Y, Wang XY, Lee YM, Byun BK, Koh YJ, Hur JS. Notes on Some New Records of Macro- and Micro-lichens from Korea. *Mycobiology* 2009; 37: 197-202.
42. Azmi NH, Ismail N, Imam MU, Ismail M. Ethyl acetate extract of germinated brown rice attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of anti-apoptotic, pro-survival and antioxidant genes. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13:177.
43. Venuprasad MP, Hemanth Kumar K, Khanum F. Neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of *Ocimum sanctum* against H₂O₂ induced neuronal cell damage in SH-SY5Y cells via its antioxidative defence mechanism. *Neurochem Res* 2013; 38: 2190-2200.
44. Wu CR, Tsai CW, Chang SW, Lin CY, Huang LC, Tsai CW. Carnosic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in in vivo and *in vitro* model of Parkinson's disease: involvement of antioxidative enzymes induction. *Chem Biol Interact* 2015; 225: 40-46.
45. Feige GB, Lumbsch HT, Huneck S, Elix JA. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid-chromatographic method. *J Chromatography* 1993; 646: 417-427.



Cork and pharmacy stoppers. The situation in 1930

Title in Spanish: *Corcho y taponamiento farmacéutico. La situación en 1930*

Ignacio García-Pereda*

¹ETSI Montes, Universidad Politécnica de Madrid

ABSTRACT: The main aim of this article is to contribute to the historical study of the clients markets in the cork sector. The study emphasizes the value of a long-term sector history perspective to clarify key aspects of economic history, related to the pharmacy business, little known at added level. Thus, from secondary sources, the article analyzes the case of the cork stoppers bought by the pharmacy industry, a group buying big quantities of stoppers for decades. The paper reveals that, among other issues, the conscience of the heterogeneity of the cork as raw material, or the organoleptic problems, did always worry the cork buyers, provoking in the pharmacy sector, their final exit.

RESUMEN: Este artículo tiene como objetivo contribuir al estudio histórico de los mercados clientelares en el sector corchero. Es una apuesta por el largo plazo y por la perspectiva de la historia sectorial como vía para esclarecer aspectos cruciales de la historia económica, relacionados con el negocio farmacéutico, poco conocidos a nivel agregado. Así, a partir de fuentes secundarias, se analiza el caso de los tapones para la industria farmacéutica, grupo que compró grandes cantidades de tapones de corcho durante décadas, hasta entrado el siglo XX. El artículo revela que, entre otras cuestiones, la conciencia de la heterogeneidad de la materia prima, o los problemas organolépticos, siempre preocuparon a los compradores de corcho, provocando en el caso de la farmacia, su abandono definitivo.

*Corresponding Author: ignaccio@hotmail.com

Received: June 10, 2015 Accepted: July 20, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 2 (2015), pp. 179-184

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde por lo menos finales del siglo XVII, el sector corchero de varias regiones de países como España o Francia protagonizó una auténtica “revolución”, al incorporar a su gama de productos más requeridos el taponado de recipientes, siendo el más conocido el de las botellas de vino espumoso de la región francesa de Champagne. Hasta entonces, apenas la fabricación de colmenas o zapatos había tenido una cierta importancia comercial. La transformación de esta materia prima, con un formato de trabajo bastante artesanal, consiguió perfeccionar los productos finales hasta el punto de rivalizar con el maquinismo más industrial hasta bien entrado el siglo XX. Pero los taponeros de zonas como el Ampurdán, en la provincia de Gerona, no eran capaces únicamente de fabricar tapones de vinos espumosos, o de vinos de todos los tipos; la gama de tapones acabados era muy variada e incluía campos como los perfumes, las aguas minerales, o los productos farmacéuticos.

Se conoce poco el entramado de relaciones comerciales del sector corcho-taponero a lo largo de la historia. La escasa bibliografía existente ha trabajado un poco el desarrollo de las redes de comercialización de las empresas

corcho-taponeras catalanas. Algunos historiadores ya han subrayado la variedad de mercados que cubrían algunas casas del siglo XIX (1), empresas que exportaban a puertos de países como Inglaterra, Francia o Alemania, principalmente.

De todas maneras, no se ha prestado apenas atención al hecho de que una porción de aquellos tapones no fuera para el sector del vino, sino para otros productos muy diferentes. Poco se sabe sobre algunos productos para los cuales el corcho fue un proveedor importante, como los perfumes o la industria farmacéutica que, durante muchas décadas, compraron grandes cantidades de tapones de corcho. En todos estos casos, hubo un momento en que productos alternativos, principalmente sintéticos, consiguieron arrebatar el lugar del corcho dentro de la lista de proveedores de estas empresas. Son hechos consumados que no se han estudiado, ni analizado sus razones, fueran económicas o relacionadas con la eficacia y calidad del producto. En un momento en que el tapón de corcho para botellas de vino ve cada día más amenazado su lugar, que ya rozó el de monopolio (2), frente a otras soluciones menos sostenibles ecológicamente, no se han analizado los detalles de un proceso vivido décadas antes por otros clientes. Un fenómeno que si fuera bien entendido, podría

permitir hoy a las empresas corcheras no perder su relación mercantil con el último gran cliente.

Este trabajo pretende efectuar una descripción de una porción de las redes de comercialización de tapones de corcho europeos en 1930, es decir, en una etapa central del desarrollo de esta industria. Después de describir algunos rasgos generales del desarrollo de los tapones no dedicados al sector del vino, el artículo se centrará en el análisis de las principales ventajas e inconvenientes del tapón de corcho farmacéutico, en una comparación con los principales productos competidores presentes en el mercado en 1930. La principal documentación utilizada es una tesis de la facultad de farmacia de Montpellier, presentada por Louis Cotte, uno de los escasísimos documentos conocidos dedicados al tapón de corcho en el sector farmacéutico.

2. EL TAPÓN DE FARMACIA ENTRE LOS TAPONES DE CORCHO

Desde principios del siglo XVIII, el negocio del tapón de corcho trajo la prosperidad a pueblos catalanes como Palafrugell, donde se había creado riqueza sobre la base de una artesanía multiplicada a gran escala, no sobre el maquinismo. En España esta industria taponera, durante un siglo bien largo, apenas funcionó en la provincia de Gerona, pionera en esta actividad transformadora, con el privilegio de beneficiarse de una prolongada hegemonía absoluta dentro las fronteras de España (3).

La situación creó con los años un ambiente social muy concreto. Transformando un producto que se vendía en países como Francia a precios altos, surge una clase local de fabricantes y exportadores, con un carácter completamente diferente de los agricultores de los pueblos de la zona. Estos taponeros se ven obligados a ser dinámicos para hacerse un hueco en los mercados extranjeros; el contacto con el exterior era directo, se adaptaban mecanismos de actuación y de pensamiento. Hasta 1900 se mantiene la constelación de pequeños talleres de trabajo manual. Entre 1800 y 1900 Palafrugell, por ejemplo, pasó de 2000 a 8.000 habitantes. Los mejores artesanos, la aristocracia obrera, como los "repasadors" de la firma Barris, ganaban 5 pesetas al día acabando 1000 tapones, una renta comparable a la de los "americanos", los emigrantes que habían regresado de lugares como Cuba (4).

La evolución del sector dependía de los avatares de las relaciones con los mercados internacionales, que a su vez estaba relacionado en parte con la adopción de políticas nacionales proteccionistas o de los conflictos bélicos. Los interlocutores de la industria local se situaban en ciudades como Londres o Reims. Era vivo el interés por la actualidad política nacional e internacional. Sorprende que pueblos tan pequeños pudieran llegar a tener un espíritu tan cosmopolita, pero así era. Se creaba lo que Josep Pla consideraría una "civilización."

Hasta poco después de la Segunda Guerra Mundial, el mercado farmacéutico supuso ser un cliente importante para los fabricantes de tapones de corcho de estos pueblos.

El corcho era el tapón elegido para lugares de trabajo que iban desde un laboratorio de química (5), hasta un gabinete de historia natural (Figura 1). Una invención importante fue la del francés Nicolás Appert (1749 -1841) maestro confitero inventor del método de preservación hermética de los alimentos (6). Appert consiguió en 1810, después de 14 años de experimentación, un procedimiento que consistía en colocar los alimentos en botellas de vidrio tapadas con tapones de corcho, sujetos con alambre y sellados con cera o lacre, que sometía a un calentamiento en agua hirviendo durante largo tiempo. Recomendaba los tapones de las montañas catalanas, eligiendo siempre un corcho muy fino de al menos 18 líneas (7).



Figura 1. Pieza del siglo XVIII del gabinete de curiosidades de la familia Salvador. CSIC-Jardín Botánico de Barcelona.

Las aguas minerales o las cervezas también fueron, durante décadas, fuertes compradores del sector corchero. En la década de 1890 la cerveza Quilmes, de Argentina, era la empresa que más tapones de corcho compraba del mundo (8). Durante el siglo XIX el tapón de corcho era la elección principal para tapar las botellas de agua mineral de España y Francia; los corchos debían ser "finos, perfectamente ajustados y enlodados para que el aparato esté bien cerrado y el resultado sea cual se requiere... Para prevenir la alteración del corcho y evitar su porosidad, se deben cubrir los tapones con algunos barnices particulares, cuya operación se llama embreado y se efectúa fundiendo a un calor suave un mastic compuesto de resina, cera, trementina, etc y sumergiendo el tapón hasta el principio del cuello de la botella, sacándole y dejándole enfriar. El mastic no debe estar demasiado caliente, sino casi pastoso y el tapón cubierto previamente de una especie de casquete de tela fina o de pergamino" (9).

Tantos en aguas como cervezas, durante casi medio siglo, la solución de taponado que sustituiría al corcho natural consistió en un "tapón corona" que todavía contaba con una arandela de corcho, que estaría en contacto con el líquido. Con 20 años William Painter (1838-1906), irlandés emigrado a los Estados Unidos, se instaló en la ciudad de Baltimore. Se trataba de un inventor en cuya carrera llegó a registrar ochenta y cinco patentes sobre los temas más diferentes: desde un asiento eyectable para los viajeros del tren hasta una máquina para detectar billetes falsos. Pero su gran aportación al mundo de la tecnología y

de la vida cotidiana mundial fueron los “tapones corona” (Figura 2), conocidos en México como “corcholatas”. En la década de 1880, un momento en que las bebidas gaseosas refrescantes estaban cada vez más de moda en los Estados Unidos, se hacía evidente que los sistemas de cierre de las botellas eran poco eficaces, cuando era necesario cerrar un líquido con mucho gas, por un bajo precio. Algunas bebidas se estropeaban con los cierres metálicos, provocando problemas sociales de salud importantes. En 1891 Painter ideó una especie de fina hoja metálica embutida en corona y doblada de una papa de corcho para asegurar la impermeabilidad, de donde procedió el nombre de la invención: “crown cork”. Como novedad, aparecía un tapón de uso único, desechable, de uso sencillo, con una buena impermeabilidad y muy barato. El gran problema fue convencer a los embotelladores y fabricantes de vidrio de trabajar con botellas diferentes, con un nuevo cuello que pudiera recibir la cápsula. Pero una vez lanzado, el éxito fue rotundo. Hasta se presentaron nuevas patentes para la creación de nuevos abridores, adaptados al nuevo sistema. Había nacido la empresa The Crown Cork & Seal Company Inc.

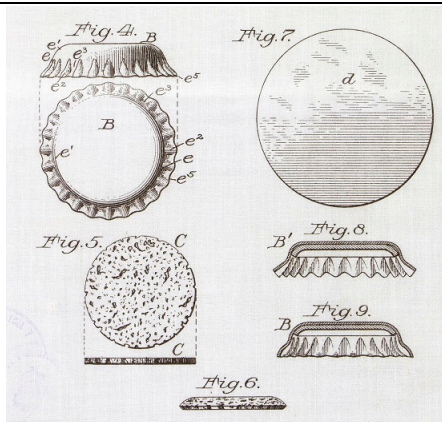


Figura 2. Dibujo de la patente de Painter (febrero de 1892). Archivo de patentes de Madrid. P-12948.

En 1904 esta firma americana ya había iniciado la actividad de una primera fábrica de España de este producto, en Palamós, con la firma Berthon. La cerveza Mahou, fabricada en Madrid, no dejó de usar tapón de corcho natural hasta 1922, cuando decidió cambiar su línea de producción para adaptarse al taponado con tapón corona (10). La cervecera mejicana Cuauhtémoc había dado ese paso en 1903 (11). En 1930 Crown Cork suministraba la mitad de tapones corona consumidos en todo el mundo. Los corcheros no miraron el nuevo invento con buenos ojos. Consideraron la llegada del nuevo producto algo extremadamente nocivo para el sector, lo llegaron a comparar a la filoxera. El nuevo tapón consumió arandelas de corcho natural hasta 1910, y de corcho aglomerado hasta la década de 1960. Fue sustituido entonces por PVC.

3. CUALIDADES Y DEFECTOS DEL TAPÓN DE CORCHO

El negocio del tapón, objeto que a lo largo de casi toda su historia se ha medido en líneas, incluía entre sus tipos

de tapones los conocidos en España como “topetas” (12), especialmente fabricadas para perfumería o farmacia. Había topetas de varios tamaños (Figura 3). Una corta tenía 10 líneas de largo (22.5 mm), mientras una topeta regular tenía 20 líneas (45 mm). Las mejores topetas francesas, *topettes*, eran las realizadas en el sudoeste del país, en la zona de las Landas y de Gascoña (13).

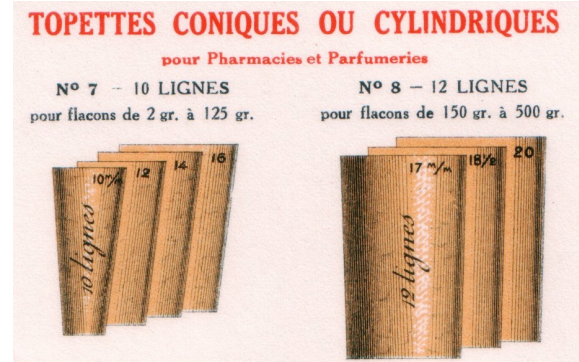


Figura 3. Detalle de una publicidad corchera. Archivo Familia Roquetta, Céret, Francia.

Si desde el siglo XVIII el corcho ganó un lugar importante como cierre de botellas y frascos, fue porque sus constituyentes le confieren condiciones de elasticidad, impenetrabilidad a los líquidos e inalterabilidad indispensables para preservar la calidad de las sustancias contenidas. Se aprovechan las condiciones de los tejidos suberosos, tejidos protectores histológicamente muertos; células muertas de aspecto prismatoide que se adaptan íntimamente entre sí, originando una estructura en mosaico (14). Las propiedades requeridas para un buen cierre (15), pueden resumirse en cuatro objetivos principales:

- Estanqueidad: el líquido o masa contenidos dentro de la botella no debe escaparse, el oxígeno no debe penetrar de forma masiva.
- Neutralidad: el tapón no debe de ninguna manera modificar la composición química ni las características visuales y organolépticas de los líquidos.
- Durabilidad: el tiempo de guarda es un punto fundamental con respecto a la elección del tapón. El contenido no debe sufrir ninguna degradación durante el tiempo de almacenamiento (Figura 4).
- Posibilidad de extracción con un esfuerzo adecuado: el acto de extraer el tapón de corcho de su botella está íntimamente ligado con una invención original, el sacacorchos.

El corcho cumple todas las condiciones citadas. Sin embargo, al ser un producto natural, presenta una desventaja, “desgraciadamente no siempre es de excelente calidad. Los corchos tienen constituciones diferentes y pueden ser presa de insectos o parásitos. Es sobre todo la falta de homogeneidad del corcho lo que obliga a los fabricantes a que sufra una cierta preparación, antes de cortar los tapones” (16). Por eso mismo los farmacéuticos recomendaban en las revistas del gremio maneras caseras de mejorar la impermeabilidad del corcho: mojando en una

masa líquida “compuesta de dos partes de cera blanca con sebo, colocados después por el extremo más grueso sobre una plancha de metal, que se pone a la estufa hasta que aquellos se sequen” (17).



Figura 4. Una de las primeras imágenes conservadas de un tapón de corcho es este autorretrato de Alexis Grimou (1678-1733), conservado en el museo de Bellas Artes de Reims.

Las aguas minerales ferruginosas, por su lado, eran de transporte bastante delicado, de conservación difícil. Sus principios se alteraban en la operación de embotellado y de transporte dentro de las botellas. Uno de los orígenes de problemas eran los ácidos tánicos del corcho, presentes en una cantidad tal que eran capaces de descomponer una porción del hierro presente en el agua. Para poder seguir contando con el tapón de corcho como solución económica de taponado de estas botellas de agua (Figura 5), surge en 1855 una patente de un inventor de Toulouse, Jean Joseph Bouloumié. La propuesta consistía en sumergir los tapones durante varias horas en una solución saturada de agua con sales de hierro, tiempo suficiente para que las reacciones de los taninos con el hierro se agotasen antes del proceso de embotellado (18).

Entrado el siglo XX, los problemas con la sensibilidad de las aguas de cara a las soluciones de taponado seguían sin ser resueltas, aunque el corcho siga siendo la mejor opción. El Consejo Superior de Sanidad de España prohibió, en 1911, el uso de tapones de porcelana o de caucho en las aguas minero-medicinales naturales, “en vista de que los principios mineralizadores de aquéllas sufren alteración con esta clase de cierre”, autorizando sólo “tapón de corcho aséptico.” (19). Sin embargo, se calcula que desde la década de 1920, la posición

dominante del tapón de corcho natural en el mercado de taponamiento de aguas y cervezas se perdió definitivamente. Más que de aguas minerales, es acerca de la industria cervecera que se conocen más datos sobre ese cambio.



Figura 5. Publicidad de agua mineral de Cantabria, donde se aprecia el taponado con corcho. Colección Euronatura.

4. LA VIEJA CUESTIÓN DE “OLOR A MOHO”

Tanto Cotte como Vieira Natividade, en 1950 (20), citaron toda una serie de defectos del corcho, entre los que destacaba la mancha amarilla, causante en ocasiones de problemas organolépticos. Se denomina “gusto a moho” o “gusto a corcho” a la sensación producida por ciertos componentes volátiles de carácter contaminante que pueden tener su origen en el tapón de corcho (21). La naturaleza de la alteración del vino conocida en Francia como *goût de bouchon*, que revierte exclusivamente en las características sensoriales del producto, explica la variedad de compuestos químicos a los que se ha atribuido la alteración. Estos compuestos son muy diferentes entre sí en su estructura química, pero todos ellos son moléculas orgánicas volátiles y muy odoríferas que en pequeñas concentraciones producen olores desagradables. Su estructura y la ausencia de precursores presuponen una vía microbiana en su generación.

Esta cuestión del “gusto a moho”, muy presente en la publicidad del sector del vino desde la década de 1980, ya era comentada y estudiada en la memoria de Cotte de 1930. Incluso antes, en 1900, ya se mencionaba el tema, atribuyendo un origen microbiológico, relacionando el defecto con problemas forestales como la “mancha amarilla.” (22). En la década de 1920, por ejemplo, había negociantes de tapones de Reims que se quejaban de recibir partidas con un 5% de “tapones susceptibles de dar aroma al tapón” (23). En 1952 técnicos franceses comentaban cómo ya se había generalizado la tendencia a que cada vez que el vino de una botella de vino presentase un sabor desagradable, el tapón de corcho fuera enseguida acusado como culpable (24).

Durante todo el siglo XX, se sucederían los intentos en la investigación europea para localizar la causa de esos malos olores que estropeaban una proporción no despreciable de botellas de vino o productos de farmacia. Sólo con la aplicación de técnicas químicas procedentes de otras disciplinas, desde la década de 1970 se empezaron a

entender los diversos procesos que provocaban estas alteraciones y, sobre esta base, se pudieron desarrollar las herramientas necesarias para mejorar el control de la calidad taponera. En definitiva, apenas entonces vinieron a coincidir las condiciones necesarias por el lado de la oferta - la renovación de los conocimientos científicos y su aplicación en el campo industrial - y por el lado de la demanda - la exigencia de un esfuerzo para resolver ciertos problemas -, para permitir las transformaciones técnicas que se comentan.

La memoria de Cotte ofrece datos interesantes sobre el grado de conocimiento sobre la cuestión, en la universidad francesa, en 1930. Cotte era de la opinión que el *goût du bouchon* se le comunicaba al líquido desde parásitos como el hongo *Aspergillus niger*, presente en el corcho cuando este tiene la “mancha amarilla”. Esta mancha, también conocida en Francia como *liège chaulé*, se producía sobre todo en alcornoques crecidos en zonas encharcadas o muy húmedas. El exceso de humedad favorece el crecimiento de ciertos vegetales cerca de la base del tronco, que provocan en la corteza de éste manchas amarillentas. Como se ve, en 1930 el “gusto a moho” ya era uno de los peores hándicaps del corcho como solución de taponamiento de productos sensibles.

5. LA AMENAZA DE LOS PRODUCTOS ALTERNATIVOS

Otro elemento valioso de la tesis de Cotte es el capítulo dedicado a “otras sustancias que el corcho empleadas para los tapones de farmacia.” El tapón de corcho siempre ha vivido la posibilidad de ser sustituido por otros materiales, como las cápsulas de aluminio en los años 30 (25), o como el polietileno en los años 60 (26). Siendo muy elevado el precio de las máquinas de embotellado, el problema de la elección del tipo de tapón siempre ha preocupado mucho a las empresas compradoras. Los esfuerzos de publicidad y propaganda de estos tapones alternativos al corcho también ha solido disfrutar de inversiones mucho mayores, pues los corcheros no han sentido “la necesidad de intensificar sus campañas de publicidad debido a la estabilidad de sus clientelas” (27).

Los materiales alternativos han evolucionado con los años. Cotte en 1930 mencionaba varias plantas (*Smithia*, procedente de Madagascar, o *Eschynomene*, de Asia), como proveedores de una materia vegetal que en cierto grado comparten las propiedades industrialmente interesantes de la corteza de alcornoque. También menciona el caucho, tanto natural como sintético. Sobre este último, comenta que en ese momento sólo era “una curiosidad de laboratorio, su precio final siendo mayor que el del caucho natural.” Sin embargo, Cotte menciona que el caucho con el tiempo se endurecía y se cortaba. La cuestión de su conservación era muy compleja, pues frecuentemente la vulcanización no se realizaba bien. El producto que presentaba más ventajas, en 1930, de cara a sustituir el corcho era el vidrio esmerilado, “un modo de cierre excelente.” La condición de estanqueidad se cumplía casi a la perfección, si el esmerilado se había hecho con

cuidado. El tapón se lavaba bien y resistía sin problemas a los ataques de agentes químicos. Sin embargo, era un material caro, poco elástico, que se rompía con facilidad.

6. COLOFÓN

Unos pocos años después de la memoria de Cotte, principalmente después de la Segunda Guerra Mundial, nuevas gamas de tapones elaborados con materia sintética acabaron sustituyendo a los tapones de corcho, en los tapamientos de los productos de Farmacia. El trabajo de 1930 da la clave de esta evolución; si en ese momento el caucho sintético era demasiado caro para sustituir al corcho o al caucho natural, dos décadas después los precios evolucionaron, y un corcho más caro que sus competidores, incapaz de solucionar sus problemas de malos olores, acabó cediendo ese lugar de mercado. Hoy en día en el sector del vino se viven debates semejantes en cuanto a los tapamientos, levantando la lectura de este artículo algunas cuestiones. ¿Será el corcho capaz de acabar definitivamente con sus problemas organolépticos? ¿Esa mejora de producto sería suficiente para no perder su importante cuota de mercado?

7. REFERENCIAS

1. Ros R. La comercialización de productos corcheros a inicios del siglo XIX, el ejemplo de la empresa "Arxer, Hijo y Cía" (1817-1820). *Revista de historia industrial* 2003; 24: 163-192.
2. Elena Roselló M. El corcho en la encrucijada: la pérdida del monopolio. *Boletín Económico del ICE* 2006; 2889: 127-145.
3. Zapata S. Del suro a la cortiça. El ascenso de Portugal a la primera potencia corchera del mundo, *Revista de Historia Industrial* 2002; 22: 109-137.
4. Febres X. *Biografía de l homenot*. Barcelona: Destino 1997.
5. Chaptal JAC. *Éléments de chimie*. Montpellier : Picot 1790 ; Garriga y Buach, J., San Cristobal, J. M. *Curso de química general aplicada a las artes*. Paris: Carlos Crapelet 1804.
6. Nobajas A. *Bottled natural mineral water in Catalonia: Origin and geographical evolution of its consumption and production*. Barcelona: Universitat de Barcelona 2013.
7. Appert N. *L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales*. Paris: Barrois 1813.
8. Medir R. *Historia del gremio corchero*. Madrid: Alhambra 1953.
9. Henry O. *Tratado práctico de análisis química de las aguas minerales*. Madrid: Imprenta de Manuel Álvarez 1858.
10. García Ruiz JL, Laguna Roldán C. *Cervezas Mahou, 1890-1998. Un siglo de tradición e innovación*. Madrid: LID 1999.
11. Pérez Sánchez B, Guzmán Sala A, Mayo Castro A. *Evolución histórica de la cervecería Cuauhtémoc: un*

- grupo económico de capital nacional. *Hitos de Ciencias Económico Administrativas* 2012; 18 (52):119-136.
12. Velaz de Medrano L, Ugarte J. El alcornoque y el corcho. Cultivo, aprovechamiento e industrias derivadas. Madrid: Calpe 1922.
13. Pouillaude C. Le liège et les industries du liège. Paris : les Impressions techniques 1952 ; Laforgue, C. L'industrie des bouchons dans les Landes. *Revue géographique des Pyrénées et du Sud-Ouest* 1931; 2: 365-371.
14. Olay E. El corcho. *La Farmacia Moderna* 1935; 25 de marzo: 144-149.
15. Pellegrin Llorente I. Estudio de la influencia de la calidad comercial y de la procedencia en el comportamiento mecánico del corcho. Madrid: Universidad Politécnica 2011.
16. Cotte L. Le bouchon pharmaceutique. Montpellier : Faculté de Pharmacie 1930.
17. *Boletín de medicina, cirugía y farmacia*, 8 de septiembre, 1847.
18. *Description des machines et procédés*, Tome 42. Paris: Imprimerie Impériale 1862.
19. *Gaceta de Madrid*, 2 de julio, 1911.
20. Vieira Natividade J. *Subericultura*. Lisboa: Ministério da Economia 1950.
21. Riboulet J. Le bouchon de liège et la qualité. *Révue Française d'Oenologie* 1992; 138: 43-45.
22. Mathieu L. Les goûts de bouchon dans les vins mousseux. *Revue Viticulture* 1, 273-278 (1900); Marril, S. Notes sur la «tache jaune» du liège. *Bulletin de la Station de Recherche Forestière du Nord de l'Afrique* 1: 331-335 (1902); Bordas, F. Sur la maladie de la tache jaune des lièges. *Bulletin Académie Sciences* 138(15), 928-929; *Ibid.* 138(21), 1287 (1904); Maige, M.A. Études sur la «tache jaune» du liège. *Bulletin de la Station de Recherche Forestière du Nord de l'Afrique* 1912; 1: 10-27.
23. *Archive Departamental, Reims, Fondo Bouchonnerie Tassigny*, 29j1-273, carta de Louis Tassigny a la corchera de Cuers "Roure Frères", 29 de marzo de 1924.
24. Pouillaude C. Le liège et les industries du liège. Paris : les Impressions techniques 1952 ; Pi i Contalle, M. Hongos y micotoxinas en taponos de corcho. Propuesta de límites micológicos aceptables. Barcelona : Universitat Autònoma de Barcelona 2007.
25. Gómez Díaz-Franzón A. Las botellas como objetos publicitarios en el Marco de Jerez (1850-1935). *Revista de historia de El Puerto* 2007; 39: 99-120.
26. Velasco L. El tapón de champagne (y III): normalización del tapón de champagne. *Boletín de Aitim* 1970; 42.
27. Salazar Sampaio J. Em torno do XI Salon International Du Matériel d'embouteillage et des industries connexes. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça* 1957;



Sesión necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. Don Gaspar González González



El Excmo. Sr. D. Gaspar González González nació en San Adrián del Valle (León) el 4 de enero de 1921. Tomó posesión como Académico de Número el día 16 de marzo de 1995 de la Medalla número 36. Falleció el día 27 de octubre de 2012. La sesión necrológica se celebró el día 8 de mayo de 2014 participando los Excmos. Señores Académicos Don Albino García Sacristán, Don Bartolomé Ribas Ozonas y Don Bernabé Sanz Pérez. Fue presidida por el Excmo. Señor Don Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.



Gaspar González González: el Profesor

Albino García Sacristán

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excelentísimo Señor Presidente.

Excelentísimas Señoras y Señores Académicos.

Distinguida Dña. Ana María, hijos y demás familia de Don Gaspar.

Señoras y Señores.

Tengo el honor por encargo de la Junta de Gobierno de esta Real Academia Nacional de Farmacia de intervenir en esta Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Prof. Dr. Don Gaspar González González para glosar su figura como profesor. Triste encargo porque representa la pérdida de un excelente académico y catedrático de Universidad.

En estos momentos que nuestras costumbres ancestrales nos hacen expresar nuestros sentimientos en forma de tristeza y pena por su fallecimiento, quizás deberíamos copiar a otras culturas donde la muerte genera otras conductas muy diferentes a las nuestras. Hace poco tiempo veíamos en la televisión como los sudafricanos, por la muerte de ese icono de la paz que fue Nelson Mandela, se manifestaban alegres y jubilosos. Ante la perplejidad de los periodistas europeos y americanos de ese comportamiento, los sudafricanos explicaban que lo que querían era agradecer y festejar la suerte de haber tenido con ellos a ese gran hombre. Sin llegar a esos extremos, sí que desearía en esta intervención recordar y felicitarnos por haber tenido con nosotros a un magnífico profesor de universidad.

Conocí al Profesor Gaspar González en el año 1970 siendo yo un joven estudiante de Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid y él un respetado catedrático. Con el paso del tiempo coincidimos en el claustro de profesores de esa Facultad y años más tarde volvimos a coincidir como académicos de Número tanto en la Real Academia Nacional de Farmacia como en la Real Academia de Doctores de España.

Durante esta larga relación y en situaciones tan diferentes para mí, primero como alumno, después como catedrático y posteriormente como académico, su trato siempre fue amable y exquisito hacia mi persona. Comparto las palabras del Profesor Ángel Vián Ortuño en su contestación al discurso de ingreso del Profesor González como Académico de Número de la Real Academia de Farmacia, en 1995, donde decía: “Don Gaspar es un leonés recio, grande, talentado, amable y bien intencionado. Por eso, en la convivencia da la simpática impresión del profesor un poco abstraído pero siempre cordialmente a punto para alumbrar una idea original”.

El Dr. González se graduó en Veterinaria en la Escuela Superior de León en 1943, a la edad de 20 años. Revalidó sus estudios en la Escuela Superior de Madrid y posteriormente se doctoró en la Universidad Central -hoy Complutense-. Completó su formación en el CSIC, en el Instituto Social León XIII y con diversas estancias en el extranjero (Inglaterra, Escocia, EEUU, Suiza, Alemania y Dinamarca), tanto en Universidades como en centros de investigación agronómica.

En la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, pasó por todas las categorías docentes. Fue Ayudante de clases prácticas (1944-1947), Profesor Adjunto por oposición y Encargado de Cátedra (1947-1951); Catedrático numerario de Fitotecnia, Economía rural y Estadística Pecuaria, más tarde denominada Agricultura y Economía agraria (1951-1987), y Emérito desde su jubilación en 1987.

Cuando el Prof. González se hace cargo de la Cátedra de Agricultura y Economía Agraria de la Facultad de Veterinaria de la UCM, sus asignaturas no eran justamente valoradas por los alumnos. En aquellos momentos la actividad profesional de los veterinarios se orientaba fundamentalmente a la clínica, especialmente del ganado equino, y al análisis post mortem de los diferentes animales domésticos, siendo, además, la producción ganadera en España mayoritariamente de tipo extensivo. Con la mecanización del campo se produce una auténtica catarsis en la actividad veterinaria, ya que al desaparecer el uso del ganado como tracción animal muchísimos veterinarios quedaron sin trabajo. La mecanización del campo supuso, además, una gran emigración de la población rural a las grandes ciudades que conllevó una mayor demanda de alimentos, haciéndose necesario el desarrollo de las producciones ganaderas intensivas, fundamentalmente avícolas, bovinas y porcinas, y por lo tanto el incremento de la producción de piensos para estos animales. Esta nueva situación de producción animal evidencia la importancia de las enseñanzas de las asignaturas que impartía el Profesor Gaspar González que van a permitir la actividad profesional de muchos veterinarios. Don Gaspar no solo contribuye en la formación de estos profesionales sino que también colabora y asesora a esas industrias vinculadas a la nutrición animal, como Bioter-Biona, Farco, Híbridos americanos, Industrias agrícolas, Lucta, etc., donde, además, varios de sus colaboradores del Instituto de Alimentación y Productividad Animal (IAPA), como los doctores Braulio Pacios, María Teresa Rollán, Erundino Alonso Fernández y Antonio Pestaña, tuvieron un papel destacado en la fundación y actividad de estas industrias, contribuyendo en

gran medida al desarrollo ganadero en España y a un mejor abastecimiento de alimentos de la población en años críticos; y ello sin la subordinación y quebranto para la economía española que suponía el pago de royalties.

En el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, fue, sucesivamente, Becario (1947-1949), Profesor Agregado (1951-1957), Director del Departamento de Producción Animal (1951-1966), Director Adjunto de Investigación (1959-1962) y Director del Instituto de Alimentación y Producción animal (1966-1986). Así como también, Consejero de Número y Vocal del Consejo Ejecutivo (1962-1969), Vocal de la Junta de Gobierno y de la Comisión de Política Científica del Patronato Alonso de Herrera y de la Junta de Gobierno y Comisión Permanente de la División de Ciencias Matemáticas, Físicas y de la Naturaleza (1969-1973).

El Prof. González ostentó, desde su creación, la dirección del Instituto de Alimentación y Productividad Animal (IAPA) y la del Departamento de Productividad y Economía agraria (DPEA), que incorporó a los doctores Francisco Sobrino, Antonio Paz Sáez y Dieter Wienberg, formados en la investigación de mercados en el “Institut für Agrarpolitik und Marktlehre” de Kiel en Alemania. Así, como también, a los doctores Manuel Ocaña y Vicente González que se habían formado en Montpellier (Francia) y en la Grassland Research Station de Maidenhead (Inglaterra) respectivamente, en práticamente fitosociológica de pastos y pascicultura. Del Departamento de Productividad y Economía agraria (DPEA) surgió el Centro Experimental Económico-Agrario “La Mayora” en Málaga, que dirigido por el citado Dr. Wienberg, ingeniero agrónomo y economista alemán, y con la colaboración del doctores Rafael Viñarás y Antonio Gómez Barcina, desarrolló las primeras investigaciones teóricas y prácticas sobre las posibilidades del sureste español para la producción y exportación a Europa de productos de huerta.

Esta presencia, tanto en la Universidad como en CSIC, le permitió, a Don Gaspar, generar una intensa actividad investigadora con numerosas publicaciones de estudios experimentales, tanto en revistas extranjeras como nacionales; la intervención como ponente en 54 Congresos nacionales y 29 internacionales, la dirección de 34 tesis doctorales, así como la traducción de textos del inglés, como los de Stiles, en 1953; Russell, en 1959; Blaxter, en 1964; Heady, en 1970 y Spedding, en 1982, o del italiano, como los libros de Tassinari, en 1954 y de Bonciarelli, en 1978, todos ellos referentes a la agronomía y economía agraria.

Además de esta fructífera actividad docente e investigadora el Profesor González realizó una intensa gestión académica. En la Facultad de Veterinaria fue Director de Departamento (1967-1987), Vicedecano (1966-1969), Decano (1973-1977) y, finalmente, Vicerrector de la Universidad Complutense (1977-1981).

Como Decano, en la época de mayor conflictividad en la comunidad universitaria, impidió la entrada de la fuerza pública en la Facultad; procuró la ordenación de las tareas docentes, la dotación de medios instrumentales a los departamentos que no los poseían y la complementación del área del campus que correspondía a la Facultad de Veterinaria. Inició en 1974, la cooperación docente con las principales empresas privadas del sector agropecuario y con profesionales cualificados enviando estudiantes de los últimos cursos para su perfeccionamiento académico y profesional durante el verano e, incluso, posterior colocación de los alumnos, anticipándose con ello a las tareas de los Centros de Orientación e Información de Empleo (COIE).

Promovió y organizó visitas a España y conferencias de relevantes científicos extranjeros como el Prof. William Davies, Director del Grassland Research Institute de Maidenhead en Inglaterra y máxima autoridad mundial en ecología praterense, quien después de un detallado recorrido por las regiones de la Cornisa Cantábrica y la región extremeña, acompañado y guiado por el Dr. Vicente González, elaboró una monografía-informe, con prólogo del Prof. Gaspar González, con el título *Los prados y los pastos de España*, que tuvo una amplia repercusión y que permitió a Don Gaspar fundar, con el apoyo de los doctores William Davies y José María Albareda, “La Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP)”, que en 2010 celebró brillantemente sus bodas de oro con más de 300 socios. En este apartado hay que citar su contribución a las estancias de Sir William Ogg, Director de la “Rothamsted Experimental Station” en el Reino Unido, del Prof. Wallace, de la Universidad de Bristol, del Prof. Blackman, Director del Departamento de Agricultura de la Universidad de Oxford, y de los doctores Raymond y van Soest, del “Grassland Research Institute” y del “Animal Science Department” de la Universidad de Cornell en EE.UU., respectivamente.

Como Vicerrector de la UCM se ocupó, con gran empeño, en la reordenación de los Colegios Mayores y en restaurar el patrimonio universitario. Recuperó para la Universidad Complutense, el Colegio Mayor Santiago Apóstol en la calle Donoso Cortés 63 -en estos momentos con dependencias de la UCM-, el Colegio Mayor José Antonio -hoy Rectorado- y el Colegio Mayor Santa María de la Almudena -actual Facultad de Educación-, que pertenecían, todos ellos, a la Secretaría General del Movimiento, y llevó con eficiencia la gestión de liberar, a favor de la UCM, la herencia multimillonaria de la Fundación Del Amo, discutida por otra institución.

Para abrir camino a futuros becarios y pensionados, se le encomendó por el CSIC visitar en Holanda, la Universidad de Utrecht donde el Prof. Walter Stiles trabajaba en oligoelementos; en Suiza el “Institut für Haustiernahrung” de Zurich, donde el Prof. Craseman trabajaba sobre metabolismo energético; en Alemania, el “Max-Planck-Institut für Tierzucht und Tierernahrung” de Mariensee, que dirigido por el Prof. Witt realizaba estudios de alimentación y genética animal aplicada; el “Institut für Tierernahrung” de Völkenrode en Braunschweig, donde el Prof. Oslage y la Dra. Schiller realizaban trabajos sobre nutrición y mejora animal, y el “Institut für Tierphysiologie und Tierernahrung” de la Universidad de Göttingen,

empeñado en investigaciones avanzadas sobre fisiología y nutrición animal. Estos Centros y por las fructíferas gestiones de Don Gaspar, dieron acogida a numerosos becarios y pensionados españoles, entre ellos a varios de sus colaboradores como los doctores: Zorita, Paz, Ocio, Guedas, Pacios y Viñarás.

Y puedo afirmar que cuando estuve trabajando, en la década de los setenta, en el Max-Planck-Institut de Mariensee donde seguía de Director el *Professor Witt*, este recordaba con gran afecto al Prof. González.

Señoras y señores, se nos ha ido una persona trabajadora, intelectualmente impecable, que en su quehacer académico supo desarrollar esa cuádruple actividad del gran maestro: *aprender, enseñar, enseñar a aprender y enseñar a enseñar*.

Aprender, porque a lo largo de su vida académica generó una fructífera actividad investigadora. *Enseñar*, ya que en sus 36 años de catedrático supo transmitir sus conocimientos a sus alumnos. *Enseñar a aprender*, formando investigadores tanto en la Universidad como en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas; y *enseñar a enseñar*, contribuyendo a que sus discípulos sean hoy prestigiosos profesores universitarios.

Deseo finalizar recordando un poema de Jorge Manrique en coplas a la muerte de su padre:

Este mundo es el camino
para el otro, que es morada
sin pesar;
mas cumple tener buen tino
para andar esta jornada
sin errar.
Partimos cuando nacemos,
andamos mientras vivimos,
y llegamos
al tiempo que fenecemos;
así que cuando morimos
descansamos.

Muchas gracias por su atención.



Excmo. Sr. Gaspar González González, perfil académico y humano

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Sr. Presidente, Excmas. y Excmos. Sras. y Sres Académicos, Excma. Sra. Ana María Doncel Urrizburu viuda de Gaspar González, querida familia de Don Gaspar, Sras. y Sres.

Tengo la gratitud de poder expresar estas palabras de excelencia académica, en homenaje del que fuera nuestro compañero y amigo, el Académico Excmo. Sr. Gaspar González González. Y como coordinador agradecemos profundamente la participación de su familia, presente en esta Sesión Necrológica.

Al farmacéutico y al médico nos concierne el ser humano en su plenitud y no solo lo que de él es accesible a la ciencia y a la técnica. Parafraseando a filósofos modernos y de la antigüedad, podemos decir, como farmacéuticos y sanitarios que, nada de lo humano nos es ajeno, y que la espiritualidad es lo que caracteriza a nuestra especie. Todo ser humano se afana una y otra vez en superar las dimensiones del mundo en el que se encuentra, en trascender y en convertir la tristeza de la pérdida de un ser entrañablemente querido en gozo y alegría. En palabras de Romano Guardini, filósofo de nuestra época, y que mi esposa ha seguido sus lecciones de 1952 a 1957 en la Universidad Ludwig Maximilian de Múnich, y como dato histórico, que el Doctor Dieter Sattler, en aquel tiempo Secretario del Ministerio de Cultura de Baviera y amigo del Presidente alemán Konrad Adenauer, crearon para Guardini una nueva Cátedra, llamada “*Christliche Weltanschauung*” (Concepto cristiano del mundo), lo que permitió su traslado a la mencionada Universidad de Múnich. Decía Guardini, “Es una característica esencial de la vida psíquica, el que el hombre una y otra vez, pueda superar el conjunto inmediato de su existencia concreta (el *dasein*),”. No es posible renunciar a ese impulso espiritual, que consideramos divino, y que San Agustín enumera: “*faciste nos ad Te.....*” (nos hiciste para Ti,.....) y a Él vamos y a Él ha vuelto nuestro querido amigo y académico Gaspar, con gozo y alegría. Y aquí nos encontramos todos los presentes, para homenajear con alegría a Gaspar, casualmente en este tiempo Pascual.

La fotografía que mostramos en pantalla, Gaspar está situado en segundo lugar por la izquierda de Su Majestad el Rey Don Juan Carlos, que fue tomada en la Palacio de la Zarzuela, en el año 2003, durante la recepción por Su Majestad Don Juan Carlos a los Académicos de Numero, de esta Real Academia Nacional de Farmacia. La siguiente fotografía en el saludo con Su Majestad el Rey.

La propuesta de Académico, de Gaspar González, fue cumplimentada y presentada por los Académicos Excmos. Sres. Ángel Vian Ortuño; Román de Vicente Jordana y Bernabé Sanz Pérez, con fecha del 14 de enero 1994 para cubrir la vacante del Excmo. Sr. Felipe Ángel Calvo y Calvo, cuyo fallecimiento tuvo lugar el 26 noviembre de 1992.

El Académico Ángel Vian Ortuño cuando era Rector de la Complutense había reclamado a Gaspar para el cargo de Vicerrector, precisamente para las tareas que tenía encomendadas el Académico Felipe A. Calvo y Calvo, a quien sustituyó como Vicerrector, y después como Académico. Ángel Vian sabía bien que Gaspar era un trabajador nato, con empeño y energía, y que podría ayudarle en la Universidad Complutense con responsabilidad y eficacia, y que si fuera admitido en esta Academia, que desempeñaría su cargo con excelencia. Y lo manifiesta en sus primeras palabras en la recepción de Gaspar como Académico: “*Don Gaspar es un leonés recto, grande, talentado, amable y bien intencionado, con tanta curiosidad intelectual y, correlativamente, tanta vida interior que su atención salta a menudo de dentro a fuera de sí*”.

Gaspar González era natural de San Adrián del Valle, de León, donde había nacido el 4 de enero de 1921; y falleció el 27 de octubre de 2012. Fue doctor en Veterinaria y profesor de Agricultura y Economía Agraria, de cuya vida científica y docente universitaria ha dado justa información nuestro compañero Académico el Excmo. Sr. Albino García Sacristán que se caracteriza por su, elocuencia, amistad y cariño.

Como decía Aristóteles: “más se estima lo que con más trabajo se gana” y así lo demostró Gaspar en sus puestos de trabajo. Ganó la plaza de Académico como otros objetivos anteriores propuestos, con firmeza e ilusión, con pulso firme y optimismo, y la desempeñó con rectitud, energía y excelencia.

Fue elegido Académico el 17 de marzo de 1994 por la Junta General de la Corporación para ocupar la Medalla N° 36 de Ciencias Afines; y tomó posesión en esta Real Academia el jueves 16 de marzo de 1995. Su discurso de ingreso tuvo por título: *Animales superiores y bienestar humano: ¿estamos legitimados para seguir usándolos?*. Y al final de su discurso, Don Gaspar terminó con la frase: “He aquí, como colofón, la respuesta que me atrevo a aventurar: Sirvámonos de los animales, pero con la dignidad que confiere el habernos sido creados personas”.

Su discurso fue respondido por el Excmo. Sr. Ángel Vián Ortuño que comenta (p. 119-120): “Tras valioso acopio de datos y razones, Don Gaspar concluye, que la distancia entre los seres por Dios creados, está marcada por el Creador, quien, además, ejerce la debida tutela, para que cada uno pueda lucir su auténtico valor; distingue dentro de lo vivo, entre las personas y los seres que no lo son, y fija en la persona la condición moral, de cuya dignidad existencial dimanan unos derechos, correlativos a unos deberes, cuyo incumplimiento ha de llevar aparejada la indignidad, y, en términos religiosos, el pecado y su castigo”. Y sigue comentando el Académico Ángel Vián, y ahora a título personal: “Yo apostillaría aquí, que Santo Tomás en su “Summa Teologica” movió el listón al mantener que el orden de animales y plantas, a cuyo uso está sujeta la vida, no la guardan ellos mismos, sino el hombre, obra de Dios”, eso señaló el que fuera Académico de esta Casa y Rector Magnífico de la Universidad Complutense Ángel Vián.

El 26 de septiembre de 1999, por acuerdo de la Junta de Gobierno se nombra a Gaspar González ponente para la Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. Ángel Vian Ortuño con el título: “Ángel Vian: Rector Magnífico de la Universidad Complutense de Madrid”.

Nuestro homenajeado realizó sus actividades Académicas desde la fecha de ingreso, en la Sección 5ª: ‘Salud Pública, Alimentación y Medioambiente’, cuyo Presidente es el actual Presidente de esta Real Academia Excmo. Sr. Mariano Esteban Rodríguez, y Secretario el que os habla. Y el 21 de diciembre de 1996 la Junta de Gobierno acordó por unanimidad incluirle también en la Sección 2ª de esta Institución: ‘Biología, Biotecnología y Farmacogenómica’; cuyo Presidente es el Excmo. Sr. Antonio Ramón Martínez Fernández. En representación de esta Sección 2ª, el 14 de octubre 2005 fue nombrado vocal de la “Comisión de Admisiones”.

Algunas de sus frases y palabras nos permitían conocer más sobre sus ideas y su pensar, iba por el camino de la fraternidad y era un hombre sobrio, tenía un gran y profundo sentido cristiano de la vida, sabía que el fin de la economía, sobre el que le gustaba hablar, es precisamente estar al servicio de los demás, de los hombres, del país y de la humanidad. Y en consecuencia intervino en la Sesión científica del 18 de abril de 1995 con el título: *Algunas consideraciones ético-morales y técnico-económicas, en torno a la interacción producción animal-medio ambiente*. Sabía que la persona más rica no es la que más tiene, sino la que menos necesita.

El trabajo bien hecho de Gaspar, en seguir la buena dirección, en aunar fuerza y conocimientos, y en el saber hacer equipo, el 15 de octubre 2001 se le nombra coordinador del Foro sobre “La salud, prioridad en el Sexto Programa Comunitario del Medio Ambiente”, que tendría lugar en Madrid, y en la sede de esta Real Academia, del 29 de octubre al 8 de noviembre de 2001, y así demostró también su entusiasta colaboración. El tema de Gaspar tuvo por título: *Perspectivas de la demanda mundial de alimentos* y tuvo lugar a las 19 horas del 7 de noviembre del año 2001.

A Gaspar le importaba hablar de la vida, de la humanidad, y decía que, esta pende y vivimos todos del campo; y es así que existimos por la agricultura. Y Gaspar nos decía en cierta ocasión, que la agricultura es la madre fecunda que proporciona todas las materias primeras que dan vida a los vivientes.

Seguimos enumerando el entusiasmo y cariño que mostró por esta Real Academia y sus compañeros Académicos, acudió a todas sus Sesiones científicas hasta que su actividad física se lo permitió y que mantuvo hasta su fallecimiento. Trataba con ilusión y entusiasmo los temas de su vocación docente e investigadora agrícola, y de la sostenibilidad de la economía medioambiental española, que conocía bien en toda su extensión, profundidad y trascendencia. Todos los Académicos le agradecemos que, nos deleitara con su amenidad, y nos brindara su respeto, amistad y cariño.

Se nos fue el querido y ejemplar Académico. Nos queda su trabajo y su recuerdo, que no es poco. En su acierto está su amor, su inteligencia y esmero en todas las cosas que hacía y opinaba, y como hemos visto y también oído de nuestro compañero Académico Albino García Sacristán, todo su trabajo lo hacía bien, y doy fe que también sabía alabar, escuchar y corregir, pedir disculpas y perdonar, era un hombre completo un admirable castellano y ejemplar español. Esperaba mucho de España y él nos dio el ejemplo de darse a ella y de trabajar de forma altruista por nuestro país. Sigámoslo. Sus amigos intentamos seguir la pauta que siguió Gaspar, del trabajo bien hecho, y en equipo.

Muchas gracias por su atención.



Excmo. Sr. Gaspar González González: el amigo

Bernabé Sanz Pérez

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Sr. Presidente,
Excmos. Sras. y Sres. Académicos
Querida Ana María, hijos y nietos,
Sras. y Sres.:

Agradezco muy cordialmente al Excmo. Sr. Presidente de esta Real Academia Nacional de Farmacia y a su Junta de Gobierno el encargo de participar en esta sesión académica en recuerdo y homenaje de quien fue uno de nuestros más preclaros académicos, el amigo y respetado compañero Prof. Dr. don Gaspar González González.

Los académicos doctores García Sacristán y Ribas Ozonas han glosado, con cariño y brillantez, la figura de nuestro homenajeado bajo sus facetas de profesor universitario y de académico; yo me referiré a nuestro compañero como amigo. Solo hablaré de algunos aspectos amistosos y destacables de su vida, como por ejemplo, su forma de comportarse con sus iguales que, como norma, superaba mucho lo que se entiende generalmente como correcto; de su cariñosa preocupación por sus compañeros y –en especial- de su interés casi paternal por sus estudiantes y doctorandos.

Mención especial merece su relación con el profesor don José María Albareda Herrera, su guía y mentor primero, compañero docente después y siempre el amigo en quien confiaba y que nunca le falló.

El bienio de 1948-49 fue decisivo en el devenir universitario de Gaspar. Siguió dos cursos que impartía el catedrático profesor Albareda Herrera en el Patronato “Juan de la Cierva” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo el título de *Origen, constitución y clasificación de los suelos: sus influencias en la vegetación y aplicaciones técnicas*. Don José María influyó mucho en la dedicación de Gaspar a la enseñanza de la Agricultura y Economía agraria. Desde que lo conoció sintió una gran estima y respeto por la honestidad intelectual de su maestro, y por el trato sincero y muy directo que, como buen bajo aragonés, mantenía con sus alumnos. Ambos iniciaron y conservaron desde entonces una entrañable amistad que se fortalecía con el discurrir de los años.

Por indicación del profesor Albareda en 1950 asistió al curso de *Economía y Política Agraria* que impartía en el Instituto León XIII el prestigioso economista don Fernando Martín Sánchez Juliá quien era, además, presidente de la Asociación Nacional de Propagandistas de Acción Católica.

Otra persona del círculo de amigos del profesor Albareda, a quien apreciaba mucho Gaspar, fue su compañero, el catedrático don Lorenzo Vilas López, con el que colaboraría algunos años después en la promoción y creación de los Institutos Laborales de Enseñanza Media. Juntos desarrollaron los programas de las materias curriculares que debían incluirse en el Bachillerato de la modalidad agrícola y ganadera y después participaron en los tribunales que juzgaron las oposiciones de selección del profesorado de estos centros.

El profesor Vilas, como saben muchos de los aquí presentes, fue catedrático de la Facultad de Farmacia de Madrid, Consejero numerario del CSIC, como también lo fue Gaspar, Vicedirector del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal y director del Instituto “Jaime Ferrán” de Microbiología.

Como hemos escuchado a nuestro académico y amigo profesor García Sacristán, el 17 de julio de 1947 Gaspar logró, por unanimidad del correspondiente tribunal, la cátedra de Fitotecnia (después Agricultura) y Economía Agraria de la Facultad de Veterinaria de Madrid, donde impartió sus saberes hasta su jubilación. Tenía entonces 30 años.

Entre sus muchos recuerdos sobre el profesor Albareda refería Gaspar que en 1949 en una conversación de sobremesa su maestro les decía a los comensales: la carrera docente universitaria, bien lo sabéis, exige dedicación, conocimiento de idiomas, no tener prisas, sí paciencia y generosidad, además de estancias en centros en donde se crea ciencia. Cumplir estos requerimientos exige renunciaciones y sacrificios, algo que muchos ni admiten ni comprenden.

Conocí al Dr. Gaspar González en 1952, recién terminados mis estudios de licenciatura. Recuerdo que era uno de esos días ventosos de la primera semana de noviembre, cuando el cierzo o viento del Moncayo azota fuertemente en Zaragoza. Estábamos en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Veterinaria el catedrático don Pascual López Lorenzo, un grupo de estudiantes de tercer curso y yo –que me estrenaba de ayudante de clases prácticas- todos alrededor de una mesa de Palmer (copiada del catálogo original británico); en la mesa yacía un pobre perro callejero anestesiado e intubado, cuya presión arterial y respiración se registraba en un quimógrafo. Miguel, el bedel, entrando en el laboratorio dijo a don Pascual que le esperaba un catedrático de Madrid. Me dejó solo con los alumnos y se marchó a recibir a su colega.

Cuando terminé la práctica fui a despedirme de mi profesor, que me dijo: “espera, quiero que conozcas a don Gaspar González, gran amigo mío y compañero del colegio Mayor “César Carlos”, es catedrático de Filotecnia de la facultad de Madrid. Me pareció un señor joven, alto, de buena facha, elegantemente vestido, afable pero algo frío y distante. Cuando lo conocí mejor comprendí lo errado de mi juicio, pues era cálido, cercano y de trato exquisito, cualidades que muy pronto apreciaban en él cuantos lo conocían. A este respecto he de señalar, que siempre que venía a Zaragoza, pasaba por la cátedra de Farmacología para charlar con su amigo don Pascual, pero nunca dejó de interesarse por el trabajo de quienes estábamos en las fases iniciales de la carrera docente: para todos tenía unas palabras de ánimo y esperanza.

En junio de 1955 tuve que ir a Madrid y visité el Instituto de Alimentación y Productividad Animal, entonces centro mixto del CSIC y de la universidad de Madrid, que dirigía el profesor Gaspar González. Estaba situado en una parcela próxima a Puerta de Hierro. Era, a pequeña escala, una miniestación agroganadera experimental que disponía de miniparcelas para ensayos agrícolas, algunas ovejas, dos vacas, y jaulas para aves y conejos. Contaba, además con laboratorio, bastante bien dotado para los años 50 y de un par de despachos.

Nuestro académico que nunca presumió de los logros conseguidos, sin embargo, en una ocasión al referirse a sus primeros colaboradores me decía, lleno de satisfacción y cariño, “gracias a ellos con esta estructura mucha ilusión y no poco trabajo hemos conseguido que se nos conozca en el mundo científico europeo y norteamericano”.

Sostenía Gaspar que entre las misiones de la universidad se olvida, a veces, el utilizar sus saberes para la resolución de problemas que impiden el desarrollo armónico del bienestar humano. Por ello, orientó sus investigaciones a la lucha contra el hambre que, en los años 40-50 del siglo pasado, se dejaba sentir con dureza en ciertos sectores de nuestra población. De aquí que dirigiera sus investigaciones a mejorar la producción de alimentos de origen animal (leche, carne y huevos), esto que exigía una buena ganadería extensiva para aprovechar los pastizales naturales y rastrojeras, además de otra intensiva (aviar, porcina y bovina principalmente) que demandaba una potente industria de piensos y complementos de los mismos. Permítanme, señoras y señores académicos, que no cite ahora a los primeros colaboradores de don Gaspar que tan a fondo se emplearon con este trabajo. Ya lo ha hecho en su intervención el académico doctor García Sacristán.

Después de la visita antes referida, no volví a ver a don Gaspar en tres años, pues becado por el *Institute of International Education* pasé tres cursos en la *Universidad de Cornell (Ithaca, N.Y.)*. Por cierto, dos prestigiosos profesores de esta universidad, los doctores Meynard -entonces profesor emérito- y Barnes -editor científico del *Journal of Nutrition*- al saber mi procedencia, se interesaron mucho por nuestro amigo, el profesor Gaspar González. Así se lo manifesté en septiembre de 1962 cuando estuve con él en vísperas de mi oposición a cátedra.

En los primeros días de diciembre, cuando exponía el primer ejercicio de la oposición que iba seguido de la temida y temible discusión de lo expuesto (la famosa *trinca*) vi entre el público asistente al profesor Gaspar González. No solo escuchó mi exposición sino que esperó, además, a que el tribunal hiciera públicas las calificaciones. Siempre recordaré agradecido esta prueba de amistad y de apoyo moral.

Creo que fue en marzo de 1963 cuando tuvo lugar en Córdoba la primera asamblea de catedráticos de facultades de veterinaria de España. Gaspar me telefoneó y dijo “cuento contigo y te ofrezco un asiento en mi coche”. Lógicamente no pude negarme y al día siguiente, por la mañana, emprendí el viaje a Madrid donde me esperaba Gaspar. En su coche -un Seat 120- continuamos el viaje a Córdoba. Cuando dejamos atrás la capital comenzamos una conversación que duró tanto como el viaje o más. No contaré todo, pero permítanme que recuerde algunas cosas:

“Pienso, decía Gaspar, que todo investigador debería comprometerse en cualquier momento y circunstancia, a mantener una investigación de calidad transmitiendo a sus sucesores sus experiencias. Solo con esto sería posible colocar a nuestro país en el grupo de los que crean ciencia”.

El éxito de Gaspar radicaba en dejar a sus estudiantes, doctorandos y colaboradores que expusieran con libertad sus propias ideas. Frecuentemente callaba y escuchaba, pero observaba y al final corregía o admitía las ideas o sugerencias expuestas; lo hacía con toda sinceridad, en una delicada mezcla de prudencia y cortesía.

Otra buena cualidad de Gaspar era que no le importaba y creo que hasta le gustaba, ceder protagonismo a sus colaboradores y doctorandos. Siempre hizo partícipes a sus compañeros y allegados de los triunfos de quienes fueron sus estudiantes.

Como se ha señalado, Gaspar mantuvo una respetuosa amistad con quienes fueron sus maestros y también con sus estudiantes y doctorandos que, después de formados a su lado, buscaron nuevos horizontes, como es lógico, en los que impartir sus saberes y emprender nuevas tareas. Esto nunca fue una ruptura y por tanto, no supuso alejamiento ni olvido, por el contrario compartían las preocupaciones y alegrías diarias y, asimismo, solían comentar y discutir los resultados de sus trabajos. También eran frecuentes sus visitas.

Añadiré que las publicaciones del grupo de Gaspar vieron la luz en las revistas de alimentación animal y de zootecnia más importantes del mundo, y que algunas de sus ponencias y comunicaciones figuran en las actas y *proceedings* de los congresos de su especialidad más valorados de su tiempo.

Séame permitido augurar que la obra de nuestro académico continuará en su ausencia, gracias a la lealtad y amistad que sembró en sus alumnos, diseminados por muchos departamentos universitarios, institutos y centros del CSIC, organismos del Estado y de la UE, grandes empresas agroganaderas, fábricas de piensos y, como él solía decir, por esos centenares de

antiguos alumnos que en el mundo rural se baten el cobre a diario en ayuntamientos, granjas y pequeñas explotaciones ganaderas.

Su capacidad como gestor universitario quedó patente en los importantes puestos que desempeñó en la Universidad y en el CSIC. Ni el profesor Albareda en el Consejo, ni otro buen amigo suyo, el rector, profesor Ángel Vian, ambos insignes compañeros de esta Real Academia, dudaron en llamarlo a desempeñar puestos de gran responsabilidad. Como decano de su facultad y vicerrector de su universidad sobresalió por el empeño y diligencia con que solucionaba cualquier asunto que se le encomendase. Buscó en todo momento la concordia y el consenso, pero tampoco le tembló el pulso cuando hubo de enfrentarse a situaciones difíciles, como la retrocesión a la UCM de los antiguos colegios mayores de la extinta Secretaría General del Movimiento o las duras negociaciones para recuperar la herencia de la fundación Del Amo.

Hoy, señoras y señores académicos, nuestra institución rinde un cálido y sentido homenaje necrológico al profesor doctor don Gaspar González, cuya caballerosidad, lealtad y bien hacer seguirán impregnando los muros de esta casa. La Real Academia Nacional de Farmacia ha perdido un gran académico, la Universidad y el Consejo un gran científico y quienes hemos sido sus compañeros y amigos una de las mejores y más exquisitas personas que hemos conocido.

Por tanto, al manifestar ahora, oficial y públicamente a su fiel esposa doña Ana María, a sus hijos y a sus nietos, la condolencia de cuantos formamos parte de la Real Academia Nacional de Farmacia y dado que Gaspar fue un hombre profundamente religioso, terminó mi pobre pero sentida intervención con las dolientes estrofas del *Testamento del pájaro solitario* de Martín Descalzo:

“Morir es solo morir. Morir se acaba.
Morir es una hoguera fugitiva,
Es cruzar una puerta a la deriva.
Y encontrar lo que tanto se buscaba.”

Muchas gracias por su atención.



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Entre las numerosas reuniones Académicas oficiales y otras también científicas con diversas instituciones, que tuvieron lugar en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia, durante el segundo trimestre del año 2015, debemos enumerar, tres sesiones de toma de posesión de Académicos Correspondientes, dos nacionales y uno extranjero; dos Mesas Redondas, cuatro conferencias y una Sesión Necrológica. También se celebró en nuestra sede y organizado por Académicos el “II Curso Avanzado de Obesidad”, que debido a la gran cantidad de inscripciones, doscientos alumnos de cuatro Universidades (Complutense, Alcalá, CEU y Francisco de Vitoria), se repitió durante dos semanas consecutivas y retransmisión “on line” para los 70 alumnos inscritos de Chile, Argentina, Brasil y México. Además tuvieron lugar una serie de actos organizados en colaboración con diversas instituciones, algunos actos comunes con la Real Academia de Doctores de España y la Academia de Ciencias Odontológicas de España a través del Convenio con la Fundación Dental Española; y finalmente Sesiones científicas con instituciones farmacéuticas).

TOMAS DE POSESIÓN

El pasado 8 de abril, en nuestra sede tuvo lugar la magistral e impactante conferencia de Toma de posesión como Académica extranjera de la Ilma. Sra. Dña. Sylvia Daunert, PharmD, MS, PhD. de la Cátedra Lucille P. Markey de Bioquímica y Biología Molecular, de la Miller School of Medicine, de la Universidad de Miami, EE.UU. Conferencia titulada: "Bionanotechnology-Based Enabling Technologies in Translational Medicine". Cuyo resumen traducido por este Secretario: Bionanotecnología basada en las tecnologías que hacen posible su aplicación en medicina traslacional. Resumen: La bionanotecnología ha creado nuevas moléculas inspiradas “designer” con una capacidad de poder ser utilizadas y llevar a cabo diversos y sofisticados experimentos a nano escala. La naturaleza ha desarrollado durante billones de años y elevado en exquisita valoración moléculas de elevada complejidad, y materiales que son fabricados en “factorías macromoleculares” localizadas intracelularmente. En las células vivas, hemos hallado estructuras y organizaciones en varios niveles, condensaciones moleculares autónomas, y formaciones espontáneas de ordenadas y/o complejas formaciones moleculares. Estas pueden actuar como moléculas sensores o indicadoras, máquinas moleculares, y aún actuar como moldes en la biosíntesis de DNA y RNA. Todos estos procesos tienen un componente para su reconocimiento molecular, que les proporciona una exquisita selectividad, y frecuentemente una inusual sensibilidad. Inspirado en eventos moleculares de la naturaleza, nuestro grupo de investigación diseña y desarrolla nuevos métodos bionanotecnológicos, recursos e instrumentos basados en la ingeniería genética, proteica y celular. Concretamente, hemos empleado el “array” conjunto de ingeniería genética y métodos bioquímicos para preparar sensores a nanoescala, biosensores, instrumentos de diagnóstico molecular y biomateriales, empleando una amplia aproximación de “arriba a abajo”. Adicionalmente, la investigación del grupo focaliza sus objetivos en la creación de nanotransportadores responsables hacia sus blancos específicos, basados en modelos de liberación de drogas. Estos sistemas son capaces de liberar la dosis exacta necesaria en el lugar preciso del cuerpo, órgano o tejido, y a su debido tiempo. Lo que presenta numerosas ventajas respecto al conocimiento actual del tema. El desarrollo de las bionanotecnologías encuentra aplicaciones en medicina traslacional así como también respecto a los campos farmacológico y medioambiental.

Fue presentada por el Excmo. Sr. D. Joan Guinovart Cirera, Académico de Número de la RANF.

En la misma semana, el 9 de abril se celebró la Toma de posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Enrique Granda Vega, Asesor farmacéutico del Presidente del Congreso de los Diputados y Presidente de FEFE Madrid, quien leyó su discurso "Crónica Amable de la Farmacia en la España constitucional 1978-2013".

En el Resumen de la conferencia puede leerse que, para muchos, los primeros treinta y cinco años después de la aprobación de nuestra Constitución, son considerados como un periodo demasiado próximo para abordar su estudio histórico: está en nuestra mente marcado con vivencias e imágenes sugerentes; ha conformado nuestra propia vida, y por ello tendemos a considerar que, con un mínimo esfuerzo seríamos capaces de recordar casi todo lo sucedido. Sin embargo,

en ocasiones deseáramos haber tomado nota de muchos acontecimientos que hemos vivido, y que se van oscureciendo con el paso del tiempo, algo que se pretende revitalizar en esta crónica.

La Farmacia, en estos años ha vivido cambios muy intensos de mano de la evolución política de nuestro país y del extraordinario desarrollo científico. Los grandes acontecimientos ya están siendo tallados por el cincel de la historia, pero hay otras pequeñas cuestiones que nos han interesado, que nos han conmovido o producido curiosidad: son la pequeña historia, la unamuniana "intrahistoria" de la Farmacia, objeto principal de este trabajo, a las que se pone el adjetivo de "amables", porque nada fundamental se ha perdido en la Farmacia entendida como arte científico, tal como la definió el Rey Don Felipe IV.

Fue presentado por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Ángel M^a Villar del Fresno.

El 7 de mayo de 2015 a las 19,00 horas, la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo lugar la Toma de posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. José Luis Pedraz Muñoz, Catedrático de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), quien impartió la conferencia titulada "Avances en el desarrollo de vectores no virales lipídicos para terapia génica".

En el Resumen de su conferencia, leemos que, la decodificación del genoma humano y los continuos avances en biotecnología han dado lugar al desarrollo de un amplio grupo de nuevos agentes terapéuticos: los ácidos nucleicos (oligonucleótidos de pequeño tamaño, ADN o ARN). La utilización de estos agentes con fines terapéuticos ha dado lugar al desarrollo de la terapia génica. La terapia génica es una nueva área de la medicina con gran impacto para el tratamiento de enfermedades, tanto hereditarias como adquiridas. De hecho, las enfermedades que pueden ser objeto de este tipo de terapia pueden considerarse desde los trastornos monogénicos hasta otros más complicados como el cáncer o el SIDA. En el desarrollo de la terapia génica hay que tener en cuenta la enfermedad objeto de tratamiento, la vía de administración, el gen terapéutico y el sistema de administración de ese gen. Es importante, que el sistema de administración permita controlar la localización del gen en el organismo, así como el tiempo que dura su expresión. A la hora de aplicar la terapia génica se puede recurrir a dos estrategias diferentes, hablándose de terapia génica "ex vivo" o terapia génica "in vivo". Cuando se recurre a la terapia génica "ex vivo" las células a tratar se extraen del paciente, se aíslan, se hacen crecer en cultivo y se someten al proceso de transfección "in vitro". A continuación se seleccionan las células que han sido transfectadas eficazmente, se expanden en cultivo y se introducen de nuevo en el paciente.

Entre las ventajas de este tipo de terapia destacan la posibilidad de elegir las células a tratar, el mayor control sobre todo el proceso y una gran eficacia de transfección. En cuanto a los posibles inconvenientes, hay que tener en cuenta la incapacidad de tratar tejidos cuyas células no puedan crecer en cultivo y los posibles problemas de contaminación. La terapia génica "in vivo" incluye técnicas mediante las cuales el material genético se introduce en las células del organismo, sin que éstas sean extraídas del mismo y manipuladas "in vitro". Desde el punto de vista clínico y farmacéutico es más aceptable el uso de la terapia génica "in vivo" que la terapia génica "ex vivo", ya que permite la utilización de las vías de administración habituales. Sin embargo, el grado de control sobre el proceso de transfección es menor, y tanto la eficiencia de transfección como el grado de especificidad tisular son bajos. Hasta el momento, los sistemas de administración de ADN basados en virus han resultado ser los más eficaces, sin embargo, el riesgo que supone su uso ha hecho que numerosos grupos de investigación nos centremos en el desarrollo de sistemas no virales, menos eficaces pero más seguros que los vectores virales.

Para incrementar su eficacia es fundamental conocer su comportamiento dentro de la célula diana, con el fin de detectar los pasos limitantes y desarrollar estrategias que permitan superarlos. La transferencia génica mediante lípidos catiónicos, ha resultado uno de los métodos más comunes y más estudiados para llevar a cabo la transferencia génica a las células. La primera utilización de un lípido catiónico en este campo, fue reportado por Felgner y colaboradores, quienes usaron el cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), para condensar y transferir DNA a células en cultivo, obteniendo unos altos niveles de expresión de gen liberado. Después de esta publicación numerosos lípidos catiónicos han sido utilizados con este fin. Es necesario resolver todavía algunos problemas asociados con la toxicidad de los lípidos y la baja capacidad de transfección, sobre todo en presencia de los componentes del suero.

El eminente científico y nuevo Académico Correspondiente fue presentado por el Académico de Número Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

SESIÓN NECROLÓGICA

El pasado 14 de mayo, se celebró en nuestra Sede una Sesión Necrológica en memoria del Académico de Número, Medalla 7, Excmo. Sr. D. Perfecto García de Jalón y Hueto, en la que intervinieron los Excmos. Sres. Académicos D. Albino García Sacristán; D. Bartolomé Ribas Ozonas; y D. Juan Tamargo Menéndez, que disertaron sobre tres diferentes facetas del Prof. García de Jalón, su vida investigadora; su perfil humano y académico; y como profesor, maestro y mentor, respectivamente.

Resumen de "Perfecto García de Jalón y Hueto: Su vida investigadora y científica".

El Prof. Perfecto D. García de Jalón nació en la localidad navarra de Viana, en 1915, realizando sus estudios de licenciatura en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Al finalizar la carrera en 1940 se incorporó a la

Cátedra de Farmacología del Prof. Benigno Lorenzo Velázquez de dicha Universidad. En esta Cátedra coinciden un grupo de jóvenes médicos y veterinarios que con el tiempo obtuvieron Cátedras Universitarias y crearon grupos de investigación activos e independientes, formando la incipiente "... Escuela de Velázquez...". Al obtener el Prof. Velázquez la cátedra de Farmacología en la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Madrid, varios de sus discípulos de Zaragoza, como García de Jalón, Sanz Sánchez, Bayo y Armijo, se vinieron también a Madrid. Poco después Don Perfecto fue pensionado por el C.S.I.C. y se traslada al Reino Unido, donde trabajó en las Universidades de Londres, Edimburgo y Cambridge junto a eminentes farmacólogos, como W. Feldberg y M. Vogt. En Cambridge trabaja con el Prof. E. Verney, eminente neurofarmacólogo, quien había descubierto las neuronas osmoreceptoras del núcleo supra óptico del hipotálamo, que llevan su nombre, así como el mecanismo de acción de la vasopresina. Al volver a España presenta su Tesis Doctoral sobre: "Farmacodinamia de sustancias administradas por vía suboccipital", y obtiene, en brillante oposición, la plaza de Profesor adjunto de Farmacología de la Facultad de Medicina de Madrid. De esta temprana etapa y en colaboración con José María Bayo, surge el trabajo por el que fue reconocido mundialmente en los laboratorios de fisiología y farmacología: el Ringer hipocálcico o "solución de Jalón", líquido nutritivo para las preparaciones aisladas de útero de rata o de cobaya. En la misma línea, fueron autores, también, de un "Nuevo método para la valoración de acetilcolina en el duodeno aislado de rata". Además, la técnica ideada por el Dr. García de Jalón para la valoración del curare fue publicada en 1947, en una prestigiosa revista de la Royal Pharmaceutical Society de Gran Bretaña, una época en la que muy pocos investigadores españoles aparecían en las publicaciones extranjeras. Algunas de estas técnicas generadas por Don Perfecto fueron recogidas en manuales clásicos de farmacología, como los textos del Prof. J.H. Burn: *Biological Standardizations*, publicado por la Universidad de Oxford en 1950, y *Practical Pharmacology*, editado por Blackwell en 1952; y también en *Pharmacological experiments on isolated preparations*, realizado por W.L. Perry de la Universidad de Edimburgo, en 1967. En 1949, en unas disputadas oposiciones, obtiene la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina de Cádiz, vinculada por aquel entonces a la Universidad de Sevilla. En Cádiz, el Profesor García de Jalón inició un trabajo silencioso que le permitió montar un laboratorio de farmacología, que dio sus primeros frutos en forma de Tesis Doctorales de futuros profesores de la Universidad española. Otro paso importante fue constituir en Cádiz una Sección del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pues reconocía la importancia científica de mantener una colaboración estable con dicha institución. Tras 13 años en la Universidad de Cádiz, el Prof. García de Jalón decidió trasladarse con su familia a los Estados Unidos, para trabajar con el Prof. G. K. Moe, uno de los más brillantes electrofisiólogos cardiacos, en el Instituto de Investigación Cardiovascular del Medical Center de la Universidad de Siracusa, con el propósito de adquirir y practicar las más recientes técnicas en la investigación farmacológica de la actividad cardiaca, especialmente sobre el nodo aurículo-ventricular, umbrales de fibrilación y vulnerabilidad cardiaca, así como, fenómenos de dispersión en los tiempos de conducción y refractariedad durante la fibrilación ventricular. Resultados que fueron publicados en la revista *Circulation Research*. A su vuelta a España, pasó a ocupar la Cátedra de Farmacología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, donde rápidamente montó un excelente laboratorio de investigación en el que desarrolló las técnicas aprendidas en los EEUU, poniendo especial énfasis en los modelos de inducción de arritmias cardiacas y en los estudios sobre el mecanismo de acción de los fármacos cardioactivos. Toda esta actividad investigadora generó la publicación de 46 trabajos referentes a estos estudios. Ello se tradujo, también, en la incorporación de un grupo de jóvenes farmacólogos que veían en el Profesor García de Jalón un maestro siempre dispuesto a enseñar, ayudar y apoyar en todo momento a sus alumnos, discípulos y colaboradores. En 1971, es promovido a Catedrático de Farmacología en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. La llegada a Madrid del Prof. García de Jalón y sus colaboradores de Valladolid, además de los existentes de la época del Prof. Velázquez permiten desarrollar una excelente actividad docente e investigadora que se estructura en tres Secciones: Farmacología cardiovascular, con técnicas de corazón aislado, potenciales de acción con electrodos intracelulares, potenciales de acción sobre fibras de Purkinje y corrientes iónicas de membrana. Farmacocinética experimental, con técnicas para el estudio de absorción, distribución, biotransformación y eliminación de fármacos, y Técnicas de implantación estereotáxica en ventrículo lateral del cerebro preparado en fibras del plexo mientérico, para el estudio de analgésicos, opioides endógenos y antihipertensivos centrales. Esta actividad va a hacer del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense un referente nacional. Con el paso del tiempo se van incorporando nuevos colaboradores, que posteriormente son o han sido profesores y maestros en las Universidades: Complutense, Córdoba, Valladolid, Cádiz, Salamanca, Oviedo, Santander y Rey Juan Carlos de Madrid. Todos estos hechos reflejan claramente la intensa y fructífera actividad científica que desarrolló el Prof. García de Jalón hasta su jubilación en 1984. También me gustaría resaltar, la fundación en 1974, junto con el Prof. Félix Sanz Sánchez y el Dr. Guillermo Tena, de la revista *Archivos de Farmacología y Toxicología*. El 3 de abril de 2014 falleció en Madrid el Prof. Perfecto García de Jalón y Hueto, una persona trabajadora, intelectualmente impecable, que a lo largo de su vida académica generó una fructífera actividad investigadora, que podemos resumir en 200 publicaciones de trabajos experimentales y en la dirección de 58 tesis doctorales; que en sus 35 años de Catedrático supo transmitir sus conocimientos a sus alumnos, formando a varias generaciones de farmacólogos, y contribuyendo a que sus discípulos sean hoy prestigiosos profesores en diversas Universidades de nuestro país. Este quehacer académico le permitió desarrollar esa cuádruple actividad del gran maestro: aprender, enseñar, enseñar a aprender y enseñar a enseñar.

"Perfecto García de Jalón y Hueto: su perfil humano y académico"

Don Perfecto García de Jalón y Hueto, Académico de Ciencias Afines a la Farmacia, medalla nº 7 de esta Real Academia Nacional de Farmacia, que tiene su origen en 1737, por Real Cédula de Felipe V que aprobó los Estatutos del Real Colegio de Profesores Boticarios de Madrid, y en enero de 1932 pasó a denominarse Real Colegio de Farmacéuticos, y el Gobierno lo transforma en Academia Nacional de Farmacia. El 15 de junio de 1936 se da entrada en su seno a doctores en Ciencias Afines a la Farmacia, que permitió años más tarde, adscribir en 1981 a Don Perfecto García de Jalón y Hueto entre sus Académicos en Ciencias Afines a la Farmacia, y cuya institución pasa en 2002 a denominarse Real Academia Nacional de Farmacia. Don Perfecto estuvo adscrito primero, y fue Presidente después, de la Sección 4ª denominada "Farmacología y Farmacoterapia", cuyo Presidente actualmente es el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez. Don Perfecto fue un gran amigo y entrañable compañero de todos sin distinción, lo que caracteriza a esta Academia, y en ella ejerció lo que indican sus Estatutos: lugar de colaboración, enseñanza y transmisión de Ciencia, y difusión de la cultura del medicamento, y lugar de encuentro e intercambio de opiniones en materia farmacéutica y sanitaria.

Don Perfecto García de Jalón Hueto, nacido el 12 de noviembre de 1915 en Viana (Navarra), y de familia histórica que hace donación al Gobierno de Navarra del archivo familiar, con documentos de los siglos XV al XX, el jueves, 24 de abril de 2014. Que ha pasado a constituir un nuevo fondo documental en el Archivo Real y General de Navarra, con un total de 14 cajas de archivo, inventariado y a disposición de todos aquellos interesados en consultarlo. Don Perfecto García de Jalón cursó la licenciatura de Medicina en la Universidad de Zaragoza, terminando brillantemente su graduación en 1940, y se integró de inmediato en el ámbito de la Farmacología. El que les habla conoció a Don Perfecto en el Congreso Nacional que él organizó de la "Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas" en julio de 1962 en Cádiz, cuyo Presidente era el Excmo. Sr. D. Antonio Gallego Fernández. Dicha Sociedad en aquellos años estaba formada por bioquímicos, fisiólogos y farmacólogos, antes de disociarse en otras Sociedades especializadas. Don Perfecto García de Jalón y Hueto organizó dicho Congreso, siendo Catedrático de Farmacología, y se celebró en la Facultad de Medicina de Cádiz, al que acudieron numerosos científicos y profesores de las Universidades españolas. Para mí, que estaba realizando la tesis doctoral en el Departamento del Profesor Ángel Santos Ruiz, antiguo Presidente de esta Real Academia, fue un evento muy significativo, pues conocí y trabé amistad con los más representativos Profesores españoles de la época y de la especialidad. Además de Don Perfecto a Don Antonio Gallego Fernández, Presidente de la Junta Directiva, y para la cual me nombraron vocal y seguidamente Tesorero, y posteriormente se me envió como delegado español en la fundación de la European Physiological Society, en Alemania. Don Perfecto nos mostró con verdadero entusiasmo, las instalaciones de su Departamento, con sus animales, y los sistemas de experimentación de tejidos y órganos aislados, como organizador de aquella reunión científica.

La propuesta de Académico, de Don Perfecto García de Jalón, fue cumplimentada el 20 noviembre de 1979 por los Académicos Excmos. Sres. Manuel Jáuregui González; Enrique Otero Aenlle y Alfredo Carrato Ibáñez. Su solicitud fue informada favorablemente por la "Comisión de Admisiones" con fecha de 21 de febrero de 1980 que admiró la competente y brillante labor, vida científica y docente como farmacólogo, de Don Perfecto. Fue elegido en Junta General de 28 de febrero de 1980, Académico de Número, para la plaza de Ciencias Afines a la Farmacia, medalla nº 7, sustituyendo en la misma al Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Martínez que había fallecido el 25 de abril de 1979, y podemos señalar con Séneca que, "el esfuerzo llama a sí a los mejores". Don Perfecto leyó su discurso de ingreso de Académico de Número titulado: "Farmacología clínica secuencial en sus aspectos cinético, farmacodinámico y terapéutico", cuya contestación correspondió al Excmo. Sr. D. Alfredo Carrato Ibáñez, en sesión celebrada el 11 de junio de 1981. Acompañaba en la Presidencia al Excmo. Sr. Don Ángel Santos Ruiz, el maestro de Don Perfecto, el Excmo. Sr. Don Benigno Lorenzo Velázquez, a la sazón Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina. En su discurso de contestación, el Excmo. Sr. Don Alfredo Carrato Ibáñez, se refirió a su compañerismo a la sombra del *alma mater* universitaria, en la Universidad de Zaragoza con Don Perfecto García de Jalón, de donde procedían y también con el antes mencionado, su Profesor y maestro, Don Benigno Lorenzo Velázquez. Sobre su perfil humano, mejor que este que les habla, describe a Don Perfecto en su discurso de contestación, el Profesor Alfredo Carrato Ibáñez, señalando que, "cuando García de Jalón estaba con el profesor E.B. Verney, ilustre farmacólogo, de Cambridge, Reino Unido, Don Perfecto siempre estaba con la pluma en ristre, presto a tomar nota de todo; detalles técnicos, datos de libros y revistas, e información de nuevos aparatos, para poder trasplantarlo con ilusión en su nuevo ambiente a su regreso a España". Alfredo Carrato señala al final de su discurso de contestación, que "García de Jalón es un ejemplo de vida perseverante en la investigación científica, sin improvisaciones ni desalientos, con la ilusión siempre puesta en un mejor servicio a la Universidad; y en integrar un medicamento dentro de una pauta terapéutica y de tener en cuenta la enorme constelación de factores en su elección y administración". Y al final de su discurso, Don Alfredo Carrato enumera los premios y distinciones de las que fue acreedor Don Perfecto, y proclama el júbilo que esta Academia celebró por la excelente adquisición al incorporarlo en su seno como Académico de Número.

El 6 de abril de 1983 fue designado por la Junta de Gobierno, junto con el Excmo. Sr. Don Enrique Gutiérrez Ríos, para acompañar al estrado al nuevo Académico de Número Excmo. Sr. Don Rafael Cadórniga Carro en su toma de posesión, acaecida el 14 de abril de ese año. La Junta de Gobierno del 10 de marzo 1988 le designa para formar parte de la "Comisión para el Estudio de Vocabulario Farmacéutico". Y en ese mismo año, la Junta de Gobierno, en sesión celebrada el día 28 de abril de 1988 le designa para pronunciar el discurso de la solemne Sesión Inaugural del Curso Académico, que fue leído el 19 de enero de 1989, con el título: "*Bases Experimentales en la Farmacología y Terapéutica del Dolor*", durante el que

señala que "el dolor como signo patológico o respuesta afectiva es tan antiguo como la existencia del hombre, por ello es un tema que en el transcurso de los siglos ha estado y está de actualidad permanente". En su discurso hace toda una extensa revisión de los mecanismos del dolor enumerando los numerosos receptores y neuromoduladores, y cuya exposición entusiasmó a la numerosa audiencia. Don Perfecto realizó sus actividades Académicas, como señalamos anteriormente, en la Sección 4ª: "Farmacología y Terapéutica", y de la que fue su Presidente. El 27 de abril de 1990 la Junta de Gobierno se le nombra para formar parte de la Comisión de la Medalla Carracido.

Don Perfecto dictó un curso de doctorado del Instituto de España, en la sede de esta Real Academia Nacional de Farmacia, con el título: "*El síndrome doloroso y su conexión con los sistemas neuroendocrino e inmune*". Siempre actualizaba como puesta al día los mecanismos del dolor y sus numerosos mediadores biológicos, fueran pertenecientes al sistema nervioso, al sistema endocrino, o al sistema inmune. La Junta de Gobierno del 18 de septiembre, le designa para contestar al discurso de ingreso como Académico de Número Excmo. Sr. Don Juan Tamargo Menéndez, que tuvo lugar el 20 de noviembre del mismo año. Don Perfecto mostró siempre su entusiasta colaboración, en todas las actividades que se le encomendaron en la Academia. Seguimos comentando el entusiasmo y cariño que mostró por esta Real Academia y sus compañeros Académicos, acudió a todas sus Sesiones científicas hasta que su movilidad y actividad física se lo impidieron. Todos los Académicos le agradecemos que, nos brindara su respeto, amistad y cariño.

MESAS REDONDAS

El 23 de abril tuvo lugar la Mesa Redonda organizada por la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales, en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF Sobre: "El Balneario de Villavieja" (Castellón). Contó con las ponencias de los Dres. Dña. Carmen de la Rosa Jorge, que habló sobre "Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario"; Dña. Esperanza Torija Isasa, que realizó el Estudio físico-químico de las aguas del Balneario"; D. Antonio López Lafuente, sobre "Características generales de los suelos circundantes al Balneario"; y Dña. Josefina San Martín Bacaicoa, con su "Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario".

El día 21 de mayo la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil tuvieron el honor de celebrar la Mesa Redonda titulada "*Virus emergentes II: Epidemiología, transmisión, morfología, biología y prevención (vacunal) de la infección por el virus CHIKUNGUNYA*".

Actuaron como ponentes: el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF: "Introducción a los arbovirus y Presentación de la Mesa"; el Prof. Dr. D. Ricardo Molina, Entomólogo, Científico Titular del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III: "Aedes albopictus: morfología, biología, emergencia y papel vectorial"; y el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF: "Virus Chikungunya. Nueva vacuna protectora".

Desde su aislamiento en Tanzania en 1953 el virus Chikungunya ha aparecido esporádicamente en África y Asia. Después de su adaptación en el mosquito tigre (*Aedes albopictus*) es a partir de 2005 cuando el virus se ha extendido rápidamente por Asia con millones de casos de infección. La presencia del mosquito en zonas no endémicas como Australia, Europa y América del Norte ha facilitado su rápida extensión, estimándose que hay varios millones de personas infectadas globalmente. El virus pertenece a la familia alfavirus, posee una cadena de RNA de polaridad positiva de unos 12.000 nucleótidos. La enfermedad se caracteriza por fiebre alta, dolores articulares muy agudos que pueden persistir durante semanas y años, pudiendo causar patologías neurológicas severas, alteraciones cardíacas e incluso la muerte. Debido a la rápida distribución del virus en los distintos continentes, se considera necesario el desarrollo de fármacos y vacunas contra dicha enfermedad. En la Mesa Redonda se presentó el estado actual sobre la epidemiología, transmisión, morfología, biología y prevención (vacunas) de la infección por el virus Chikungunya.

CONFERENCIAS

Todas las conferencias se celebraron en colaboración con al "Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF".

El 16 de abril tuvo lugar la conferencia titulada: "*Tratamiento quirúrgico de la obesidad*", como colofón y cierre de la Segunda Edición del Curso Avanzado sobre Obesidad, que fue pronunciada por el Excmo. Sr. D. Jesús Álvarez Fernández-Represa, Presidente de la Real Academia de Doctores de España. Le presentó la Excmo. Sra. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número de la RANF.

El 30 de abril se celebró en la Academia la Conferencia titulada: "*El receptor alfa-2 adrenérgico de la célula cromafín de la médula adrenal: ¿Una nueva diana para el tratamiento del dolor neuropático?*", pronunciada por el Ilmo. Sr. D. Antonio Rodríguez Artalejo, Académico Correspondiente de esta Corporación. Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just, Académico de Número de la RANF.

El 28 de mayo tuvo lugar la conferencia titulada: "*La Hoja de Ruta 2015-2020 de OMS sobre Enfermedades Parasitarias Olvidadas*" pronunciada por el Prof. Dr. Santiago Mas-Coma, Catedrático de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Valencia y que fue presentado por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

El Profesor Doctor Honoris Causa, D. Santiago Mas-Coma es Catedrático de Universidad, Director de Departamento de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. Vicepresidente y Presidente electo de la Federación

Internacional de Medicina Tropical (IFTM). Experto de la Organización Mundial de la Salud (WHO/OMS). Miembro de la Orden Internacional del Mérito (IOM). Ex presidente de la Federación Europea de Parasitólogos (EFP). Coordinador del Comité de respuesta rápida de tratamiento de enfermedades parasitarias de la EFP. Ex presidente de la Sociedad española de Parasitología (SEP). Director del Centro Colaborador de la OMS sobre Fasciolosis y sus moluscos vectores. Director del Centro de referencia de Parasitología FAO-Naciones Unidas. Director del curso Master internacional sobre enfermedades parasitarias tropicales.

En el Resumen de su conferencia consta que en la última década se ha verificado la importancia del impacto de las denominadas "enfermedades olvidadas o desatendidas" ("neglected diseases" en inglés), un conjunto de enfermedades mayoritariamente parasitarias que afectan a una gran proporción de la humanidad y que se encuentran en el trasfondo del subdesarrollo en extensas regiones del mundo. La Organización Mundial de la Salud ha respondido recientemente al desafío planteado por estas enfermedades mediante un análisis exhaustivo de la situación mundial de cada una de ellas. Así como una guía y listado de metas a alcanzar para los periodos hasta el 2015 y el 2020, incluyendo medidas de lucha y protocolos de control así como objetivos pretendidos bien definidos en las diferentes regiones endémicas. El éxito inmediato de esta Hoja de Ruta se ha constatado por el estímulo general conseguido y por la respuesta unánime de los diferentes actores en el mundo de la salud. Sin embargo, dicha Hoja de Ruta se basa en los conocimientos disponibles sobre estas enfermedades en sus diferentes zonas endémicas actuales. Y en estos últimos años ha surgido una problemática subyacente a modificaciones que estas enfermedades están mostrando como consecuencia del impacto del cambio climático (y no únicamente del calentamiento global). Así como del impacto del cambio global, esencialmente referido a modificaciones antropogénicas del medio ambiente.

Formando parte del conjunto de las enfermedades olvidadas, algunas se ven más afectadas por dichos cambios que otras. Dentro de las que más exteriorizan la influencia de estos cambios se cuentan las enfermedades helmintianas causadas por Trematodos Digénidos, en gran parte debido a la marcada susceptibilidad de los moluscos vectores que las transmiten a las características climáticas y abióticas del medio. La Fascioliasis humana, la Schistosomiasis y la Dermatitis cercariana constituyen ejemplos bien evidentes de enfermedades que están mostrando modificaciones en prevalencias, intensidades y distribución geográfica, hasta el punto de requerir análisis especializados mediante técnicas de predicción que permitan prepararnos para tanto el escenario inminente y esperable a corto plazo como lo que vaya a suceder a más largo plazo.

El 11 de Junio tuvo lugar la interesante conferencia pronunciada por el Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, Académico Correspondiente de la RANF y de Número de la Nacional de Medicina, con el título: "*Albert Einstein, 100 años de Relatividad General: El Universo que conocemos hoy*".

Con este evento la RANF ha conmemorado, según nuestro filósofo Ortega y Gasset "*el hecho intelectual de más rango que el presente puede ostentar*" (Ortega y Gasset, *El sentido histórico de la Teoría de Einstein*, 1923).

Como Resumen aportamos que, en 1915, en el fragor de la primera guerra mundial, después de manifestarse como pacifista y universalista, Einstein, tras sucesivas revisiones de sus ideas, concluyó su magna tarea del establecimiento de las denominadas *ecuaciones de campo*. Es decir, de la formulación de la Teoría de la Relatividad General, nueva teoría de la Gravitación que sustituiría a la de Newton.

En tanto que teoría física formalizada matemáticamente, la Relatividad General implicaba la concepción de numerosas nuevas *predicciones* implícitas en sus ecuaciones, predicciones que han ido superando las 'pruebas de fuego' del contraste con los sucesivos nuevos descubrimientos observacionales cósmicos (expansión del Universo, la singularidad del origen en el tiempo, el modelo cosmológico estándar, ... ¿Las ondas gravitacionales generadas en el *Big Bang*?).

Su revolución trascendió hacia la filosofía y el pensamiento todo. La teoría de la relatividad, con la presencia de Einstein en España en 1923, se recibió con júbilo por nuestros científicos, caso de Cabrera y Terradas, y por nuestros filósofos, como Ortega y Zubiri.

Uno de los pilares de la Cosmología actual -"el Universo tal como lo conocemos hoy"- lo constituye la teoría de Einstein que mantiene su vigor 100 años después de su formulación.

CURSOS

La Real Academia Nacional de Farmacia celebró entre el 13 y el 16 de abril de 2015 el "**II Curso Avanzado sobre Obesidad**". Dirigido por los Dres. María Cascales Angosto y Carlos Calvo Monfil (Chile) y coordinado por los Excmos Sres. D. Francisco José Sánchez Muniz; D. Bartolomé Ribas Ozonas; y D. Antonio Luis Doadrio Villarejo, quien al mismo tiempo fue el Editor DVD, y diseñador del Programa y carteles. Contó con las intervenciones de científicos y docentes del más alto nivel investigador, como a continuación se puede observar en el programa expresado a continuación. Información adicional de este curso puede leerse al inicio de esta Memoria.

El curso resultó un éxito abrumador con una demanda de inscripciones que sobrepasó todas las expectativas, con la participación de estudiantes jóvenes, prioridad de esta Academia por atraer y formar a la juventud española y también mundial. La participación de numerosos estudiantes de Chile, Argentina, Brasil y México lo justifican. Por tal motivo, la dirección del Curso decidió repetirlo durante la semana del 20 al 23 para dar cabida a todos los matriculados. Además, al igual que el año pasado, se ofreció la modalidad "on line", por la que se matricularon y beneficiaron un gran número de

alumnos.



**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIANACIONAL DE FARMACIA**

SEGUNDO
CURSO AVANZADO
SOBRE
OBESIDAD

13-16 de abril 2015

La obesidad, la enfermedad metabólica más frecuente en el siglo XXI, es punto de partida de patologías: síndrome metabólico, diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedad coronaria, etc. La obesidad es difícil de tratar, pues muchos fármacos lo han intentado sin éxito y prueba de ello es su progresivo y alarmante aumento, que no parece posible detener. Por estas razones, se han multiplicado los programas para combatirla, que constituyen hoy un tema prioritario de Salud.

MATRICULACIÓN
1-28 de febrero de 2015
Coste: gratuito
Información e inscripción:
secretaria@ranf.com

Real Academia Nacional de Farmacia
c/ Farmacia 11, 28004-Madrid
+34-91-5310307

Dirección
Maria Cascales Angosto
Carlos Calvo Monfil (Chile)
Coordinación
Francisco J. Sánchez Muniz
Bartolomé Ribas Ozonas
Edición
Antonio L. Doadrio Villarejo

Créditos ECTS concedidos por:
Universidad Complutense, Universidad de Alcalá de Henares,
Universidad Francisco de Vitoria, Universidad San Pablo CEU



13 de Abril (Lunes)

- 17,00 **Introducción.** Mariano Esteban Rodríguez.
- 17,15 **Obesidad: epidemia del siglo XXI.** Maria Cascales Angosto
- 17,45 **Obesidad y balance energético.** Gregorio Varela Moreiras
- 18,30 **Discusión y Descanso**
- 19,00 **Importancia de la dieta en la obesidad.** Francisco J. Sánchez Muniz
- 19,45 **Avances en el tratamiento farmacológico de la obesidad y la diabetes.** Walmir Coutinho
- 20,30 **Discusión**

14 de abril (Martes)

- 17,00 **Lipogénesis de novo y termogénesis.** Maria Cascales Angosto
- 17,30 **Regulación endocrina de la obesidad.** Evangelina Palacios Aldiz
- 18,00 **Contaminación y obesidad. Obesógenos.** Antonio Luis Doadrio Villarejo
- 18,30 **Discusión y descanso**
- 19,00 **Tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad.** Manuel R. Benito de las Heras
- 19,45 **Dieta y riesgo de enfermedades cardiovasculares.** José Antonio Gutiérrez Fuentes
- 20,30 **Discusión**

15 Abril (Miércoles)

- 17,00 **Dieta milagro.** Francisco J. Sánchez Muniz
- 17,30 **Alimentos de interés en sobrepeso y obesidad.** Esperanza Torija Irujo
- 18,00 **Restricción calórica y obesidad.** Bartolomé Ribas Ozonas
- 18,30 **Discusión y descanso**
- 19,00 **Resistencia a la insulina, inflamación y obesidad.** Manuel Serrano Rios
- 19,45 **La obesidad a lo largo de la Historia.** Francisco Javier Puerto Sarmiento
- 20,30 **Discusión**

16 abril (Jueves)

- 17,00 **Obesidad infanto-juvenil.** Carlos Calvo Monfil
- 17,30 **Dislipemia aterogénica: su asociación con la obesidad y el síndrome metabólico.** Carlos Calvo Monfil
- 18,00 **Genética de la obesidad.** José María Ordóñez Muñoz
- 18,45 **Discusión y descanso**
- 19,15 **Tratamiento quirúrgico de la obesidad.** Jesús Álvarez Fernández-Represa
- 19,45 **Discusión**
- 20,00 **Clausura y entrega de Diplomas**

OTROS ACTOS EN LA RANF

El 13 de abril, por tercer año consecutivo, la Fundación de Ciencias de la Salud, en colaboración con la Real Academia Nacional de Farmacia, organizó el ciclo: “*Los valores de la historia*”. En ésta ocasión, aprovecharon para celebrar que ha pasado un siglo desde que la Historia de la Farmacia se profesionalizó en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, aunque la materia se impartía desde 1858 a cargo de personas sin la suficiente formación en la misma. Con ese motivo, el Dr. Juan Esteve de Sagra, Catedrático de la disciplina en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Barcelona y Decano de la misma, dictó la conferencia titulada: “*El medicamento: valores y garantías*” con la que pretendió cubrir la doble finalidad de adherirse a la celebración académica y cumplir con los fines de la Fundación dedicada, fundamentalmente, a la Bioética.

El 11 de mayo, la Academia de Ciencias Odontológicas de España (ACOE), celebró una Sesión Solemne para la investidura del Ilmo. Sr. D. José María Vega del Barrio, Catedrático de la UCM, quien pronunció su discurso titulado: “*Biocompatibilidad de biomateriales: un viejo concepto, una nueva complejidad*”. Le contestó en nombre de la Academia el Ilmo. Sr. D. Bernardo Perea Pérez. El acto se celebró bajo la presidencia del Excmo. Sr. Secretario D. Bartolomé Ribas Ozonas y los Prof. Dres. D. Antonio Bascones su Vicepresidente y de D. Honorio Bando Casado, Secretario de la Comisión Gestora de la ACOE.

Asimismo han tenido lugar varios actos del GRUPO COFARES en nuestra sede “*Intervención Farmacéutica en Patologías Prevalentes*”, el día 28 de abril se celebró una conferencia sobre “*Urticaria y atopía*” y el 26 de mayo sobre “*Alergias medicamentosas en intolerancias alimentarias*”.

El 27 de mayo a las 19 horas la Real Academia Nacional de Farmacia, MSD y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, celebraron la Jornada “*Educación en Salud en las Oficinas de Farmacia*” con el objetivo de impulsar una mejor formación en la Salud en las Oficinas de Farmacia.

ACADÉMICOS

En cuanto a los honores, premios, distinciones y nombramientos que han recibido nuestros Académicos durante este último trimestre, hay que destacar, que,

el 13 de abril la Académica de Número de la RANF, la Excmo. Sra. Dña. María del Carmen Francés Causapé, fue nombrada Miembro de Honor del Instituto Médico-Farmacéutico de Cataluña.

El 17 de abril, tuvo lugar en el Aula Unamuno de la Universidad de Salamanca (Edificio Histórico) el solemne acto académico de toma de posesión, como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Castilla y León, de nuestro compañero el Académico Correspondiente de la RANF, el Profesor Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata. El acto estuvo presidido por el Presidente de la Academia de Castilla-León D. Carlos Gómez Canga-Argüelles y la presentación del nuevo Académico corrió a cargo del Profesor Miguel Ladero Álvarez, Académico de Número de la Corporación. El discurso de entrada versó sobre “*Hábitats y vegetación natural del Parque Regional de la Sierra de Gredos (Castilla y León)*”.

El Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de la RANF fue galardonado con el Premio Albert Jovell, a la mejor iniciativa desarrollada por profesionales sanitarios que mejore los resultados de salud de los pacientes. Se premió el trabajo de 10 años, desarrollado por un grupo de farmacéuticos, médicos y enfermeras que forman un grupo interprofesional denominado Tormes Team, dedicado al tratamiento integral de los pacientes VIH en el Hospital Universitario de Salamanca. Para nuestro Académico, como impulsor y coordinador del grupo este premio tiene un significado muy especial.

El 5 de junio fue investido Dr. Honoris Causa por la Universidad Pontificia de Salamanca, nuestro Académico Correspondiente Pedro Guillén García. Y también le fue concedida la Medalla de Oro de la Comunidad de Madrid, que le impuso su Presidente Ilmo. Sr. D. Ignacio González.

El Académico Correspondiente Prof. Dr. Eduardo L. Mariño Hernández, de la Universidad de Barcelona, leyó su discurso de “toma de posesión” en la Academia de Farmacia de Paraguay.

La Junta de Gobierno del 18 de junio de 2015 revisó y aceptó las solicitudes propuestas por unanimidad por las Secciones respectivas, de los Académicos Correspondientes extranjeros pendientes, eligiendo por orden de antigüedad de presentación, a lo Dres. Cristina Branquinho de la Universidad y Jardín Botánico de Lisboa; Claude Monneret, del Instituto Curie de París y Vicepresidente de la Academia Nacional de Farmacia de Francia, y próximo Presidente por rotación; y al eminente Prof. Walmir Coutinho, de la Universidad de Rio de Janeiro, Brasil, y Presidente de la Sociedad Mundial de Obesidad.

El 18 de junio se celebró una Junta General Extraordinaria en la que fue elegido Académico de Honor el Dr. Michel C. Nussenzweig, en base a su liderazgo mundial en el entendimiento de las bases moleculares de la respuesta inmune innata y adaptativa. En su último trabajo en la revista “*Nature*” demuestra el papel de anticuerpos monoclonales en el control de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.

Asimismo en otra Junta General Extraordinaria, celebrada el mismo día 18 de junio, ha resultado elegido para ocupar la

vacante de Académico de Número en la Medalla 30 el Excmo. Sr. D. Sebastian Cerdán García Esteller.

OTRAS ACTIVIDADES REALIZADAS POR NUESTROS ACADÉMICOS

Se ha publicado online la segunda edición del libro "*Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*" editado por Elsevier, del que son autores la Excmo. Sra. Dña. Carmen Avendaño López y el Dr. José Carlos Menéndez, Académico Correspondiente.

En mayo fue publicado el libro "*Monitorización de fármacos en la práctica clínica*". El coordinador de la obra es el Prof. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca. La monitorización de fármacos en la práctica clínica es un libro electrónico publicado en mayo de 2015 y editado por Amazon. Este libro es una iniciativa de los profesores que participan en el curso "Monitorización de fármacos en la práctica clínica" que se celebra cada año en la Universidad de Salamanca desde 1982. El curso es una actividad académica dirigida a postgraduados universitarios en ciencias de la salud que está incorporada al programa de formación permanente de la Universidad de Salamanca. El libro, de 360 páginas, consta de 14 capítulos que abarcan aspectos generales y específicos de la monitorización de fármacos incluyendo inmunosupresores, antirretrovirales, anticuerpos monoclonales, etc.

Nuestro Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just lidera un grupo de investigación llamado OCUPHARM que investiga sobre "una lentilla 'inteligente' que poco a poco va dispensando el medicamento, de una significación posiblemente revolucionaria, para pacientes tanto desde el punto de vista nacional como mundial. Las pruebas sobre esta "lentilla inteligente" en animales han dado resultados positivos. Se antoja como una solución eficaz y barata para combatir el glaucoma, la segunda enfermedad que provoca ceguera después de las cataratas.

En el mundo hay 285 millones de personas con discapacidad visual. La OMS considera que el 80% de la población mundial que sufre casos de discapacidad visual se podrían evitar o curar. Si no se combaten, el 33% se quedará ciego por las cataratas y el 2% por padecer glaucoma. En España, las patologías oculares más prevalentes son las cataratas, el glaucoma, la degeneración macular asociada a la edad, el desprendimiento de retina y el ojo seco. Todas tienen cura, bien sea a través del quirófano o con la administración de fármacos. Los abordajes para solucionar estas patologías pueden ser muy diversos y normalmente se realizan a través de tratamientos farmacológicos y en algunos casos exclusivamente a través de cirugías oculares. No existen oficialmente tratamientos farmacológicos para las cataratas o el desprendimiento de retina, pero sí para el glaucoma, el ojo seco y la degeneración macular asociada a la edad.

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al nervio óptico. Este deterioro provoca una pérdida visual que de manera gradual puede terminar en una ceguera total. Un aspecto importante de esta patología es que los pacientes no muestran síntomas hasta que detectan cierta pérdida de la visión, que se produce principalmente en la periferia de su campo visual, lo que significa que la retina neural periférica está muriendo debido a la falta de suministro sanguíneo. En la mayoría de los casos, el glaucoma está relacionado con problemas en la hidrodinámica del humor acuoso que se encuentra en el interior del ojo. El humor acuoso es un líquido transparente que ocupa el segmento anterior del ojo. El humor acuoso permite al ojo mantener su forma mediante el establecimiento de la presión correcta dentro de esta estructura. Esta presión, denominada presión intraocular, es mantenida gracias al equilibrio entre la producción y evacuación del humor acuoso.)

El problema que tienen los enfermos de glaucoma son los efectos secundarios de los fármacos, ya que si padecen otras patologías (como problemas coronarios) no los pueden tomar. Los β -bloqueantes pueden causar bradicardia e hipertensión y por consiguiente no son adecuados para los pacientes con problemas cardíacos. Tampoco lo son para los que tienen asma o enfermedades pulmonares obstructivas o distrofias corneales. Unos efectos que no se presentan si se utilizan las lentillas, porque al administrarse el fármaco de manera gradual este tipo de enfermos los toleran sin problemas.



Editorial

VI Encuentro de Academias de Farmacia Iberoamericanas. Barcelona 25-27 marzo 2015

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

OBJETIVOS

El objetivo primordial de la reunión de las Academias de Farmacia Iberoamericanas fue, principalmente, dar a conocer las Academias de Farmacia y el ámbito del medicamento a la sociedad de su propio país. Para ello es imprescindible difundir su existencia y sus actividades a través de los medios de información y de las comunicaciones. Llegar a la juventud y población en general para hacer presente las Academias y la divulgación del conocimiento científico, dando por supuesto las instituciones, Facultades universitarias, Asociaciones farmacéuticas, y otras afines. El asesoramiento a las autoridades sanitarias, profesionales y estatales figura en sus Estatutos. Para ello se consideró de interés el contacto con los Institutos y Colegios de Enseñanza a los que afluye la juventud que constituirá la futura sociedad.

Todo ello es posible por el posicionamiento de las Academias, con su opinión profesional e independiente sobre el conocimiento expreso del medicamento, sus orígenes, posología en función de la fisiología, bioquímica y patología del ser humano, y el asesoramiento a las autoridades legislativas o jurídicas, las sanitarias, farmacéuticas, profesionales afines y la sociedad en general, para el bienestar y calidad de vida de la humanidad.

Todos los objetivos mencionados, se consideran dentro del contexto de lo aconsejado por Su Majestad el Rey Felipe VI, con la difusión indispensable a los medios de comunicación y aplicación de las Tecnologías de la Información y de las Comunicaciones, para el conocimiento de las Academias por la Sociedad en general y en beneficio de la Humanidad.

TEMAS DE DIFUSIÓN

Entre los temas de difusión por las Academias a la Sociedad se comentaron los siguientes: Origen, desarrollo del medicamento, su Registro y control, las vacunas, los fármacos, los productos innovadores, los medicamentos genéricos, los productos biológicos, los biosimilares, las plantas medicinales, entre otros. A los que se añadieron: la Farmacovigilancia y el asesoramiento al Ministerio de la Salud, el seguimiento del medicamento, explicar a la sociedad que es el medicamento, su objetivo de eficacia, el concepto de posología y efecto dosis-peso, la seguridad y eficacia y ante la patología, humana, y la confianza en los efectos ante el fraude, el engaño y la adulteración, en referencia a su venta en internet. Con ello se consigue la eficacia medicamentosa y curación o mejoría de la enfermedad, y la evidencia del efecto farmacológico en interés del paciente.

PRÓXIMA REUNIÓN

Se tomaron las decisiones que las reuniones sean bienales, y que la próxima que se denominará “VII Encuentro de Academias de Farmacia Iberoamericanas” sea organizada por la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Paraguay y tenga lugar en 2017 en Asunción, Paraguay. Y que la Academia Nacional de Farmacia de Francia, de la que estuvo presente su delegado el Académico Claude Monneret, actual Vicepresidente, sea considerada Invitada permanente.

Propuesta de adherirse a las Conclusiones, y si se cree oportuno aportar alguna más, a las propuestas del “VII Congreso Internacional de Medicamentos Huérfanos y Enfermedades Raras” (Mehuer), de febrero 2015 de Sevilla, España, a su vez a propuesta por la Comisión científica de la Academia catalana, y todo ello a consideración de todas las Academias de Farmacia Iberoamericanas, para su consenso, aprobación y difusión.

ESTRUCTURA DEL ENCUENTRO

Se desarrollaron 3 Mesas Redondas con la participación de los miembros de las Academias iberoamericanas, una

conferencia de inauguración por la Excm. Sra. Dña. Montserrat Baiget de Barcelona; y otra de clausura por el Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia de España, Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega, de la Universidad de Navarra.

Mesa Redonda “Vacunas y Salud Pública”.

Moderada por el Dr. Rafael Sentandreu Ramón de la Real Academia Nacional de Farmacia, participaron como ponentes los Académicos Dres. Alfonso Ruiz Bravo por la Academia Iberoamericana; Antonio Stephano por la de Brasil; Irma Romo por la de México; Tomás Pumarola por la de Cataluña; y Aquiles Arancibia por la de Chile.

Se resaltó la abrumadora actualidad del tema basándose en que gracias a la utilización de vacunas el paisaje de las enfermedades infecciosas ha variado totalmente. Las vacunas, con los antibióticos, son responsables del aumento de la esperanza de vida del hombre, y la primera de la erradicación de la viruela y del control de enfermedades como la difteria, la poliomielitis, o el sarampión. Sin embargo, la aparición de resistencias junto a la de nuevos agentes infecciosos, como el ébola, resalta la importancia que tiene el mantenimiento y el desarrollo de las infraestructuras para nuevas vacunas en Salud Pública.

La mayoría expresaron la historia de la vacunación y los efectos beneficiosos de las vacunas cuya primera prueba fue demostrada por *el inglés Jenner* y la vacunación general de la población por *el español Balmis* (año 1800), que con niños de un Asilo de La Coruña, para mantener la eficacia se vacunaron las poblaciones de la América española y Filipinas, como barruntos de lo que sería más tarde la OMS (Organización Mundial de la Salud). Redujeron la incidencia de la viruela aumentaron la calidad de vida de la poblaciones, desde México hasta Chile y Filipinas. Es el medio más racional de colaboración en Epidemiología y Medicina Preventiva que entra en íntima conexión con la aplicación clínica y experimental y la investigación, lo que llamaríamos *medicina traslacional* o aplicación de la investigación en los pacientes en atención primaria. El uso razonable de los recursos públicos, solidarios y beneficiosos en Salud Pública, para el bienestar y salud de la sociedad y de la humanidad.

Se demostró que las vacunas reducen la prevalencia de las enfermedades infecciosas, su eficacia e intervención clínica eficiente. Producen además el efecto beneficioso colectivo de grupo al no diseminarse la infección y menor riesgo de infección de los no vacunados. Atención primaria, centros docentes, centros sanitarios. Establecer estrategias de actuación y coordinación en el entorno sanitario y hospitalario, como ha ocurrido con el *ébola*.

Como cualquier otro método profiláctico terapéutico, las vacunas también pueden tener efectos adversos, aunque benignos y de escasa trascendencia clínica, pero siempre de inferior patología que la propia enfermedad que pudiese haber contraído. Vacunación de las poblaciones de riesgo al contagio, los sanitarios, trabajadores de Hospital y transporte de enfermos. Constituyen una estrategia preventiva y valiosa, de las autoridades sanitarias y otros ámbitos como la Industria farmacéutica para el desarrollo y la aplicación de las mismas, con profesionalidad y rigor por personal sanitario actual (médico, farmacéutico y enfermería).

Necesitamos nuevos programas de vacunación no solo en países en desarrollo sino también en el primer mundo. Basta decir que más de 500.000 personas mueren anualmente en los EEUU por infecciones que podrían haberse evitado con la correspondiente vacunación. Entre estas infecciones se encuentra la *neumonía* producida por neumococos y la *gripe*.

Se expuso que las vacunas autorizadas en España contienen antígenos preparados por tecnologías clásicas y que hoy se deben incorporar vacunas obtenidas por técnicas más avanzadas (DNA, etc.). Se continuó señalando que las nuevas normativas deben contemplar la introducción de antígenos detectados por técnicas genómicas (vaccinología inversa) y el uso de coadyuvantes alternativos que permitan modular la respuesta inmune y orientarla en el sentido más adecuado.

El ponente de Brasil comunicó avances muy significativos obtenidos en la vacunación a nivel nacional y resolución de algunos de los problemas pendientes. La ponente de México expuso el reconocimiento a nivel continental de ser pioneros en la obtención de vacunas, así como por la cobertura de las vacunaciones en su país. Se destacó que la empresa Birmex (Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A.) empresa mayoritariamente estatal desarrolla, produce, importa y comercializa vacunas y anti-venenos.

Durante el desarrollo de la mesa redonda se hizo énfasis en el hecho de que la profesión de farmacéutico es, ante todo, una profesión directamente relacionada con la salud. Se consideró que las Academias y otras instituciones científicas, académicas y profesionales afines, deben tener un mayor compromiso con la formación del profesional farmacéutico, tanto a nivel de paciente como en actividades de planificación y desarrollo en Salud Pública incluyendo prácticas de vacunación e inmunización.

Hemos asumido en este resumen las “Recomendaciones de la Real Academia de Farmacia de Cataluña sobre Vacunaciones y Salud Pública, Barcelona 2014.

Mesa Redonda “Medicamentos huérfanos”

En esta segunda Mesa Redonda moderada por la Dra. Elvira Bel de la Real Academia de Cataluña, participaron como ponentes los Académicos Dres Manuel Pérez Fernández por la Iberoamericana; Gabriel Mato por la de Argentina; Anselmo Gomes de Oliveira por la de Brasil; Inés Fuentes Noriega por la de México; José Aliaga por la de Perú; y Aquilino Corral por la de Murcia.

Después de una breve introducción por la moderadora de los Currículo de los ponentes y de la trascendencia del tema que conoce profundamente, cedió la palabra a los ponentes. El que suscribe entendió que en Argentina las autoridades sanitarias conocen bien los temas en el ámbito de la eficacia, seguridad y calidad de los medicamentos y de los alimentos para el ser humano y la Sociedad. Se comentó la relevancia de la tecnología y del desarrollo de los sistemas automáticos de envasado, empaquetado y transporte de estos productos para su comercialización.

Se continuó con el enfoque y la trascendencia de los medicamentos huérfanos y las enfermedades raras, sus redes y Asociaciones de pacientes en Argentina. Utilizó una elevada pedagogía para demostrar el impacto e importancia de su tema. Siguió con los requerimientos específicos de los pacientes. La disponibilidad comercial, etc.

El ponente de Brasil expuso una magnífica y completa relación de revisiones de medicamentos huérfanos; y disertó sobre la íntima relación entre enfermedades raras y los medicamentos también raros. El que esto escribe entendió que en Brasil no hay programas específicos para las enfermedades raras, sino que cada paciente dispone de un bono o valor universal mensual de aproximadamente 250 dólares. Para enfermedades raras, dispone Brasil de 104 medicamentos de alto costo para consumo universal. Tiene un gasto de 771 millones de euros, para 14 enfermedades raras. También es aceptable prescribir un medicamento sin registro.

De México observamos un amplio y exhaustivo resumen sobre los medicamentos huérfanos y los problemas de los fármacos huérfanos. Se explicó que una enfermedad rara puede aparecer en cualquier momento de la vida, y también agravarse la posiblemente cursada. Existe un acuerdo entre COFEPRIS y la Industria Farmacéutica. Muestra una interesante tabla de comparación de evaluación entre medicamentos de solicitud y de otorgamiento de medicamentos huérfanos, haciendo hincapié en la hemoglobinuria paroxística nocturna.

Y de forma similar, observamos una interesante y atractiva exposición sobre el estado del arte en Perú. Se comentó sobre los medicamentos huérfanos, su relación y control por el Ministerio de Salud, y que el problema se enfoca y actualiza desde octubre de 2010. La Ley 29698 declara el interés, prevención, diagnóstico y tratamiento de las Enfermedades Raras y Rehabilitación de las personas que las padecen en Perú. Principalmente son atendidas las que cursan con peligro de invalidez y peligro de muerte.

El Poder Ejecutivo dicta y promueve la enseñanza, difusión de las enfermedades raras. Asimismo se ocupa de la formación de los sanitarios, y usuarios y de la Sociedad en general. También existe la Federación Peruana de Enfermedades Raras. La Ley de 22 de febrero 2014 considera más de 399 enfermedades raras; y otras en las que los pacientes no pueden ser atendidos (Esclerosis múltiple y Miastenia gravis). Se apunta también que, en algunos casos, los médicos tardan mucho en poder establecer un diagnóstico claro y seguro.

Finalmente, en la Comunidad Autónoma española de Murcia, parece ser que existe una excelente red de planificación y ayuda al paciente para las enfermedades raras y su posible tratamiento. Más bien vimos, si no nos equivocamos, que se trata de un tratamiento más empírico que científico de bioquímica molecular. Por su originalidad sorprendió a la audiencia, y que posteriormente fue largamente discutida, porque indica para cada uno de los trastornos un remedio, medicamento o en su caso una preparación farmacéutica.

La adhesión y Conclusiones del “VII Congreso Internacional sobre Medicamentos Huérfanos y Enfermedades Raras”, de Sevilla, que se comentó al inicio de ese Resumen, se expresan a continuación:

- 1) Los registros específicos de pacientes con enfermedades raras son una herramienta imprescindible para abordar la atención integral de estos pacientes y requieren de un marco jurídico que asegure su sostenibilidad y una adecuada coordinación con las CCAA.
- 2) La investigación en enfermedades raras, tanto aplicada al diagnóstico como al tratamiento, requiere ser potenciada desde una visión innovadora que combine financiación pública y privada.
- 3) Las enfermedades raras comparten bases patológicas con las enfermedades más prevalentes. Por ello, su investigación aporta un valor adicional general en el campo de la salud.
- 4) La formulación magistral tiene razón de ser como tratamiento en ausencia de formulaciones industriales de medicamentos huérfanos autorizados y registrados. Siempre la formulación debe dar respuesta a las necesidades de los pacientes.
- 5) En cualquier comité fármaco-terapéutico o fármaco-económico donde se evalúen las enfermedades raras y sus tratamientos, deben participar de pleno derecho los representantes de estos pacientes.
- 6) Debe garantizarse la equidad en el acceso a la atención socio-sanitaria integral y la unión entre niveles asistenciales, dentro del sistema nacional de salud.
- 7) Es preciso favorecer estrategias de comunicación y transparencia para dar a conocer a los pacientes los recursos actualmente disponibles para su diagnóstico y tratamiento.
- 8) Para asegurar la equidad de una adecuada asistencia sanitaria se precisa establecer un fondo de cohesión nacional en los presupuestos generales del Estado, debidamente dotado.

- 9) La concienciación de los equipos de Atención Primaria y su coordinación con la Atención Especializada son clave para que se entienda la necesidad de detectar y registrar correctamente a los pacientes con enfermedades raras. Las recomendaciones sanitarias de los profesionales en este ámbito, deberán incluir aspectos relacionados con la vida doméstica, desplazamientos, tiempo libre, actividad laboral y autocuidado.
- 10) El asociacionismo de los pacientes con enfermedades raras en España está experimentando una evolución favorable. En nuestro país, FEDER agrupa a 285 asociaciones que totalizan más de 83.000 pacientes. Asimismo, FEDER es la entidad nacional que más asociaciones aporta a la agrupación europea EURORDIS, con 60 de sus 667 entidades.
- 11) Es necesario desarrollar completamente el proyecto EUROPLAN como forma de coordinar y armonizar la atención de los pacientes entre las Comunidades Autónomas y con la Unión Europea.
- 12) El cuidador del paciente con una enfermedad rara es una figura primordial en la atención de estos pacientes y se requiere un mayor compromiso por parte de la administración pública para asegurar soporte económico, social y formativo para éste.
- 13) La actuación contra la exclusión social de los pacientes con enfermedades raras debe considerar también a la familia y a los entornos de acogida.
- 14) Los derechos del niños deben garantizarse y protegerse especialmente en el caso de los pacientes pediátricos con enfermedades raras, dada su particular vulnerabilidad.
- 15) Es necesario el consenso de todos los partidos políticos a favor de la causa de las enfermedades raras, en el que se comprometan a que, gobierne quien gobierne, anualmente se celebre en la televisión pública programas que permitan la concienciación y la recaudación de fondos, como un tele-maratón, en pro de la investigación de las enfermedades raras.
- 16) No debe olvidarse que en las enfermedades raras lo que está en juego es la vida de los pacientes y, aunque aquellas sean infrecuentes, cada paciente es único y exige un abordaje multidisciplinar en centros de referencia y unidades de expertos.
- 17) En definitiva, consolidar esfuerzos es una responsabilidad compartida.

Mesa Redonda “Falsificación de Medicamentos”

Fue moderada por el Académico Salvador Cassany en la que participaron los ponentes Académicos Dres. Manuel R. Limeres por la Argentina; Andrés Amarilla por la de Paraguay; Josu Juárez por la de Perú; Lauro Domingos Moretto por la de Brasil; y Alfonso Domínguez-Gil por la de Castilla León y Real Academia Nacional de España. Tuvo lugar en Laboratorios Alcón, Masnou, que guarda y mantiene el Museo Cusi de Farmacia, de titularidad privada (Real Academia de Farmacia de Catalunya). Se trata de una instalación farmacéutica benedictina del siglo XVIII procedente del Monasterio de Santa María la Real de Nájera, La Rioja, España, y de una colección de recipientes cerámicos procedentes de distintas zonas de España, de los siglos XVIII y XIX.

En Argentina se considera la falsificación de medicamentos como una lacra para el Sector Farmacéutico, la que se debe prevenir y combatir porque incide directamente en el riesgo para la salud de los ciudadanos en Salud Pública. Considera los medicamentos falsificados como ilegítimos, y menciona como un primer caso conocido de falsificación de un medicamento que tuvo lugar alrededor de 1.850. Y pasa a considerar que Argentina tiene un Programa de Pesquisa de Medicamentos Ilegítimos 1997-2010.

En la exposición se mostró una Pirámide, en cuyo vértice superior se veía los Medicamentos ilegítimos, en segundo lugar de la pirámide los falsificados, en tercer lugar bajando en la pirámide el contrabando de muestras médicas, y continua hacia abajo con la adulteración, y los de fecha de vencimiento; y en su base coloca los medicamentos no autorizados. Se comentó que el falsificador suele disponer de una importante instalación, similar a la del fabricante autorizado, y la caja del medicamento tiene el mismo color, tamaño y letra; y asimismo un prospecto idéntico, todo ello muy difícil de diferenciar.

Entre 1997 a 2010 se realizaron en Argentina unas 40.000 inspecciones de muestras con sospecha, que refleja en gráficas por años. Al inicio de las inspecciones se identificaron como falsos un 6% y en 2005 se redujo el porcentaje a un 0,28%, lo que demostró la *eficacia de un control*, y el éxito del Programa, para detectar medicamentos falsificados. Ante las dificultades, la falsificación pasó del bajo precio a alto precio, y de la falsificación a la adulteración y relleno. Se pasó a falsificar según su acción terapéutica: antibióticos; Analgésicos; desinfectantes; ansiolíticos; antiespasmódicos; descongestivos; antimicóticos; y antiácidos. En Argentina a las distribuidoras se les retiene un 10%.

Con respecto a Paraguay, también la falsificación de medicamentos es trascendental, y es considerada por las autoridades una penosa realidad, pues son muy difíciles de diferenciar unos de otros, por sus características tanto de color y organolépticas. La responsabilidad corre a cargo del *Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social*. Y se dispone de la fortaleza del Sistema de Salud con un marco legal y vigente adecuado. Se realiza monitoreo de los medicamentos. Se expusieron los *factores que facilitan la falsificación* en Paraguay; así como la Legislación inadecuada, la Autoridad nacional reguladora y de control del medicamento con escaso poder, Sanciones ineficaces, Precios elevados de los medicamentos, Falta de difusión y de conciencia acerca del problema de la falsificación, Cooperación ineficiente entre los organismos de la salud y cámaras farmacéuticas y Ministerios.

Existe gran debilidad de control, y comenta que el problema se debería atacar en su conjunto, y cuya dificultad estriba que Paraguay está rodeado por *diversos países* y posee una frontera frágil y con gran facilidad de ingresar medicamentos tanto los correctos autorizados como los falsos. También se expuso que el Sistema de Salud presenta una deficiencia para

un control efectivo del medicamento, por la entrada en el país a través de sus fronteras: aire y por tierra. Existen muy bajos recursos humanos. El 30 % de los medicamentos en el país son falsificados, lo que significa un % altísimo. La Agencia Reguladora de Medicamentos inspecciona el nº de lote, la caducidad, etc.

Sin embargo, hubo grandes avances, porque se ha formado una mayor conciencia en la población; y el control de los medicamentos por las autoridades ya que un 75 % de los medicamentos de consumo en el país son importados. Se han secuestrado e incautado 1.600 envoltorios; 1.500 envase de Hemogenil; y 6.000 inyectables. Todo ello conduce a imaginar y plantear un negocio subterráneo considerable. Se han incautado productos farmacéuticos robados y falsificados; productos precursores químicos y medicamentos falsos en el Chaco; se expropiaron 26 toneladas de almidón en Paraguay de camino a Bolivia, pues nuestras fronteras son de fácil trayecto y trasvase. Otros avances en Paraguay se han realizado mediante una estrategia planificada, con la Revisión de la normativa vigente; mediante campañas educativas en radio, TV, prensa, Boletines, actividades institucionales, contactos con Cámaras de Comercio, Relaciones entre países, Alertas al Fiscal General del Estado. Algunos de estos medicamentos falsificados se han incautado por llegan al país a través de productos de las Tecnologías de la Información y de las Comunicaciones (TIC), y ocasionan un grave problema a la Salud Pública.

Se observó en Paraguay que existe una vinculación directa de la falsificación de medicamentos con el crimen organizado, que tiene incidencia sobre la vida de las personas y la sociedad del país, y en definitiva de la humanidad. Es una industria que daña a la población, cuyas ganancias son fuente de financiación de otros hechos punibles.

En Perú se señala que el problema es un flagelo de la humanidad; y que la OMS indica que es difícil de establecer con precisión el valor real de esa problemática y de su mercancía, pero que se trata de un mínimo del 10% del mercado farmacéutico mundial. Al norte limitan con Ecuador y entran los adulterados, falsificados y con fecha de caducidad superada. Con Colombia existe el mismo problema y con Bolivia y Chile también. Y en la actualidad se extiende con Brasil, con la reciente inauguración de vía de intercambio comercial facilitándose los transportes. Todo ello hace pensar en los intercambios y la colaboración formales locales y puntuales. Se han incautado recientemente 500 toneladas de medicamentos falsificados, en el mismo edificio de plantas debajo del Poder Judicial (?). En un Centro registrado como Droguería, en el que se hallaron 1.500 toneladas de medicamentos falsificados, y en esa planta estaban registrados unos 30 locales comerciales o establecimientos de venta al público (?). Sus propietarios han denunciado a los inspectores farmacéuticos por irregularidad en sus especificaciones y el proceso sigue adelante con demoras. Por otra parte se ha detectado un Laboratorio clandestino, que tiene un farmacéutico responsable, que firma y cobra, por la apertura y deja su responsabilidad, y desconoce los asuntos internos de ese laboratorio.

Se nos explicó que la estrategia de Perú en ese sentido, ha sido crear un Grupo Técnico Contra el Fraude de medicamentos. Se trata de un Grupo multisectorial presidido por el Ministerio de Salud y por su Secretario Ejecutivo, denominado CONTRAFALME. Está compuesto por varias Comisiones entre ellas: de Educación y difusión; de Normas Legales; y de Fiscalización. Se organizan campañas a nivel nacional contra el comercio ilegal de productos farmacéuticos y afines. Es importante su difusión en instituciones educativas. Se ha actuado en 7 Colegios con 800 niños que son los más preceptivos a la información y a la educación, mediante charlas, videos, con participación con estudiantes de Universidad, con mensajes visibles e inteligibles, también en lugares públicos, sobre todo con mensajes alusivos dirigidos a la juventud.

En Brasil es muy actual el problema de los medicamentos falsificados, y conocimos el concepto sobre estos medicamentos, la evolución de la legislación y su convergencia con la OMS. Se indican las fuentes de falsificación, con laboratorios bien instalados, con similar infraestructura que los autorizados de productos farmacéuticos y afines, en su país con 202.700.000 habitantes.

Se presentan numerosos medicamentos falsificados y fraudulentos, que clasifica en 5 categorías, entre ellas la 1ª de fatalmente fraudulentos. Y la 5ª difícilmente identificables. Muestra gráficas con la disponibilidad de 160 entidades fabricantes. En Brasil desde 1976 a 2014 señala el estado de la legalización y registro de medicamentos. Y la Regulación de toda la Comercialización y Legalización de Medicamentos. Ley 11903 de 14 de enero 2010. Y la Ley de Combate de la falsificación de medicamentos nº 54 de 10 diciembre 2013. Muestra gráficas que siguen la farmacovigilancia desde los fabricantes y los importadores incluyendo los órganos de Gobierno hasta los Centros de Salud. Señala las interrelaciones entre la fármaco-vigilancia y la falsificación de medicamentos. Y se habla de la trascendencia de los efectos de los medicamentos, su fármaco-vigilancia y la trazabilidad del medicamento.

Se discute la complejidad del control del medicamento. Sugiere que la cadena de aprovisionamiento es frágil y vulnerable. Y habla también del bloqueo de la penetración y entrada en Brasil de los medicamentos falsos. Existe una entrada múltiple, no solamente por tierra, mar y aire, sino también por internet. Se debe identificar y multar al fabricante de medicamentos falsos.

Propone la contribución y el significado de las Academias ante el combate con la falsificación de medicamentos, señalando que: a).- se trata de un desafío para las Academias y para los organismos nacionales. b).- esfuerzo de organización internacional, de organismos reguladores, etc. c).- fiscalizar las fuentes de producción de los medicamentos.

En España se explica el problema de la falsificación de medicamentos por su inmersión en Europa. Se muestra que la falsificación de medicamentos es un problema tal, del que conocemos solo su punta visible, equiparándolo al Iceberg, lo que sobresa, y lo que identificamos con nuestra vista. Se revisan diapositivas explicativas del “Counterling” o cantidad total del

problema según área geográfica alcanzando unos 5 a 150 mil millones de euros/año; que en España corresponde aproximadamente a un 5 al 15% del PIB. Se nos explica una evaluación en 124 de los 193 países que atañe a la empresa Pfizer que aporta datos sobre su localización en todo el mundo, y como ejemplo cita el medicamento *Herceptin* para el cáncer de mama. Explica la vulnerabilidad de la cadena desde la fabricación y la distribución del medicamento, que implica a países emergentes como China y la India, citando al laboratorio Rambachi de la India respecto a medicamentos; y también se refiere al problema de la escasa calidad de los excipientes.

Se explica la trascendencia de los mecanismos de distribución de los medicamentos, en los que se introducen falsificaciones, como ha sido el caso de la *toxina botulínica falsificada*. Y se amplía n los conocimientos sobre la exposición con los Sistemas de Producción y Sistemas de Distribución, que inciden directamente en la seguridad de paciente y Salud Pública. Se hace referencia las Good Distribution Practice Group (GDP) que bien se conoce en España desde el 2007 RD 782/13 de 11 octubre sobre la distribución del medicamento.

Comenta que debe aplicarse la tecnología (TIC) frente a la falsificación de medicamentos y se comenta una clasificación al respecto. Y añade un Informe USA, sobre esta lucha que se estima en aproximadamente 1,2 billones de dólares. En Europa tenemos estándares GS1 lenguaje de comercialización y negocios de eficacia y seguridad del medicamento. La serialización consiste en identificar cada envase individualmente mediante códigos de barras de 2 dimensiones “Datamatrix” o radiofrecuencia. La falsificación de medicamentos se ha convertido en un delito a escala global. Según las predicciones del “Center for Medicine in the Public Interest”, de Estados Unidos, la venta de medicamentos falsificados alcanzaba un volumen de aproximadamente 55.500 millones de euros en 2010, un incremento de más del 90 por ciento desde 2005.

La EFPIA (“Federación Europea de Industrias y Asociaciones Farmacéuticas”) trabaja en un sistema de verificación de productos «punto a punto», basado en la serialización en masa. En estos momentos la industria farmacéutica ve como solución más viable la serialización mediante Datamatrix – Códigos DataMatrix 2D ECC200 con estructura GS1 128 – por la cantidad de información que pueden incluir, su tamaño reducido y los bajos costes de su implementación. También nos entrevistamos con una serialización emergente a nivel mundial. Francia y Turquía adoptaron la serialización Datamatrix en los envases individuales, por lo que las empresas de otros países que comercialicen en estos territorios deben cumplir también con el nuevo sistema. Además hay varios países que están implementando esta serialización mediante datamatrix, por lo que se espera un empuje importante a corto plazo.

Dentro de la Organización Mundial de la Salud existe el IMPACT (International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce), que lucha contra la falsificación de medicamentos, el cual ha publicado un documento titulado “Tecnologías anti-falsificación para la protección de los medicamentos” donde divide las tecnologías disponibles en cuatro grupos, que analiza en detalle (<http://www.who.int/impact/events/IMPACT-ACTechnologiesv3LIS.pdf>). También comenta que a nivel mundial, según la OMS, el 50% de los medicamentos son falsos; y el 97% de las Farmacias que operan en internet son falsas.

En España se dispone de la Ley 10/2013 de 24 de julio. Se comentó también en la reunión la OPERACIÓN PANGEA a través de la cual la Interpol desarrolló en 81 países la Operación Pangea IV, contra la venta ilegal de medicamentos en internet. Esta operación internacional finalizó con un total de 55 detenidos, el cierre de 13.500 páginas web que se dedicaban a la venta ilegal de fármacos y la incautación de 8.000 paquetes con 2,4 millones de píldoras y pastillas de antibióticos, esteroides, tratamientos contra el cáncer, contra la depresión, contra la epilepsia, así como suplementos alimentarios y productos adelgazantes, por un valor total de 6,3 millones de dólares.

También nos deleitamos con la campaña, *FIGHT THE FAKES* (<https://www.fightthefakes.org>) a la que se unieron el pasado año once nuevos socios, llegando a un total de veinticinco organizaciones miembros. Los nuevos socios, representando a comerciantes mayoristas, farmacéuticos, servicios de aplicaciones móviles, coaliciones para la protección del consumidor y fabricantes farmacéuticos de genéricos, se unen a la campaña para hablar en alto y divulgar el impacto devastador de las medicinas falsas. Estas organizaciones se unen a un grupo diverso de socios destacados, incluyendo profesionales sanitarios, organizaciones de enfermedades específicas, institutos de investigación, asociaciones de desarrollo de producto, fundaciones sin ánimo de lucro y el sector privado.

Y finalizamos con el comentario del ponente sobre el adagio de “*primum non nocere*” lo primero es no causar daño. Se trata de una máxima aplicada en el campo de la medicina y ciencias en salud, atribuida al médico griego Hipócrates. Esta máxima es uno de los principales preceptos que a todo estudiante de medicina se le enseña pero que debe ser extensiva de forma universal para la Humanidad entera.

CONFERENCIA DE CLAUSURA “LA RESPONSABILIDAD SOCIAL DE LAS ACADEMIAS DE FARMACIA”.

Por el Académico de la RANF, D. Antonio Monge Vega, que señala que las Reales Academias Nacionales están amparadas por los Gobiernos de cada país, y en España por la Corona, por pertenecer a ellas Académicos del total del país, y en el nuestro se rigen por el Real Decreto en referencia al Instituto de España. Estas gozan de independencia del poder político y económico, y sus objetivos primordiales son la enseñanza, cultura, la educación y difusión de la ciencia y el avance de los conocimientos científico.

Su Majestad el Rey de España Felipe VI, señaló que sus objetivos debieran ser: 1) la transmisión de conocimiento, con especial atención a la juventud, siendo dinamizadoras del mismo. 2) incrementar la imagen de las Academias, y conectar con la sociedad. 3) mantener la independencia institucional. 4) conseguir patrocinios generales no sólo con grandes empresas si no también con la mediana empresa que puede encontrar en las Academias una institución que aporte mayor visibilidad social. 5) incrementar la vinculación con otras Academias y las relaciones externas (iberoamericanas y europeas. 6) buscar asociación privilegiada con otras organizaciones, asesorando a instituciones nacionales e internacionales, para que la información sea contrastada y se produzca una mayor precisión en los datos publicados.

En definitiva la Sociedad merece que se ocupen de ella las Academias y el significado de las Academias no termine en el ámbito académico. Estas deben salir a la calle. El Papa Pio XI se refirió a ellas y la Academia Vaticana de la Santa Sede se ocupa de temas científicos de actualidad al servicio de la Sociedad. Siguió refiriéndose el conferenciante a que la RANF forma parte del Instituto de España desde el año 1946, en beneficio de la Sociedad y de los derechos humanos; y enfatizó que *“las Academias de Farmacia serán lo que sus Académicos que la forman quieran que sean”*.

También deben las Academias de ocuparse de temas paradigmáticos, como el aborto, la eutanasia, el medicamento, fármaco-vigilancia, y temas que han sido tratados aquí como virus, vacunas en Salud Pública, los medicamentos huérfanos, medicamentos falsos, etc. La futura formación farmacológica y medicamentosa del farmacéutico, y por su prestigio social valiosísimo respecto a la evolución de la enfermedad, sin entrar en competencia con nadie, siendo neutral e independiente, será en el futuro más decisiva. Y las Academias tienen peculiaridades diferentes a otras instituciones y organizaciones.

Y la reunión finalizó con su Asamblea General de la Asociación de Academias de Farmacia Iberoamericanas, cuyas Conclusiones se relacionan al inicio de este Informe. Y para finalizar, a las 21 horas, tuvo lugar la Cena de Clausura oficial, por gentileza de la Conselleria de Salud de la Generalidad de Cataluña, en el Hotel Catalonia Ramblas.

Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario RANF.



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA