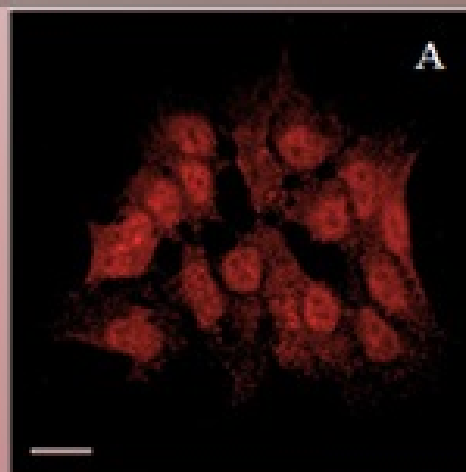


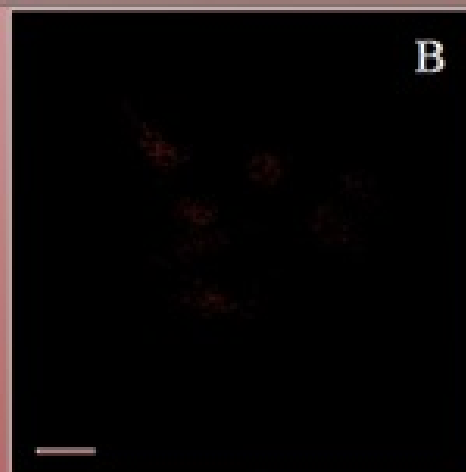
ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 81 | Número 3 | Julio – Septiembre 2015

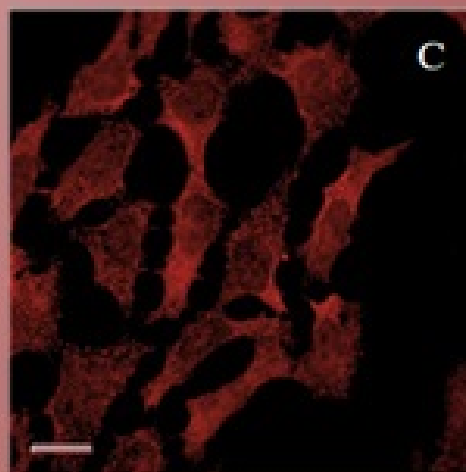
P2Y₁



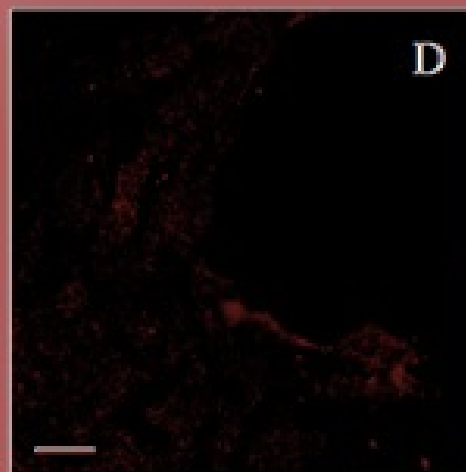
B



P2Y₆



D



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA
NACIONAL DE
FARMACIA



Instituto
De España



Ministerio de
Educación Cultura
y Deporte

Publicación científica electrónica trimestral

Madrid, Spain

BET inhibitors. The odd compound (+)-JQ1

Title in Spanish: *Inhibidores BET. El singular compuesto (+)-JQ1*

Carmen Avendaño¹

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

ABSTRACT: The serendipitous discovery of (*bromodomain extra-terminal*) (BET) inhibitors, especially of the BRD4 bromodomain inhibitors, has allowed modulation of gene transcription with epigenetic drugs. This is the case of protooncogen *c-MYC* and other genes involved in carcinogenesis and different disfunctions. These drugs, that include the compound (+)-JQ1, have shown their potencial as anticancer agents, immunomodulators, male contraceptives, antiviral, or heart failure chemopreventive agents, among others. In this review we analyze their discovery, structure, mechanism of action and future perspectives.

RESUMEN: El descubrimiento fortuito de los inhibidores BET (*bromodomain extra-terminal*), y en especial de los inhibidores del bromodominio BRD4, ha permitido modular con fármacos epigenéticos la transcripción del protooncogén *c-MYC*, entre otros genes implicados en la carcinogénesis y otras disfunciones. Estos fármacos, entre los que se encuentra el compuesto (+)-JQ1, han mostrado su potencial como anticancerosos, inmunomoduladores, anticonceptivos masculinos, antivirales, o agentes preventivos del fallo cardíaco. En esta revisión se analiza su descubrimiento, estructura, mecanismo de acción y sus perspectivas futuras.

Corresponding Author: avendano@farm.ucm.es

Received: July 20, 2015 **Accepted:** October 27, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 3 (2015), pp. 214-220

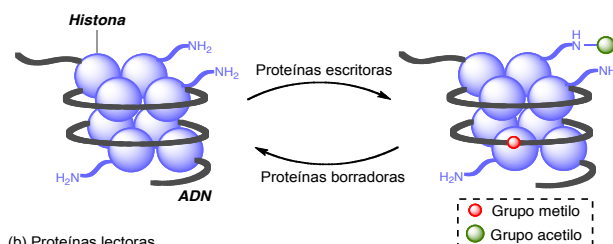
Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de ligandos de proteínas epigenéticas se ha dirigido fundamentalmente a las enzimas que modifican la cromatina en el nucleosoma actuando como “escritoras” (*writers*) o “borradoras” (*erasers*) (Figura 1a) (1). Sin embargo, los residuos de lisina acetilados de la cromatina y de otras proteínas son también lugares de reconocimiento y enlace específicos de otras proteínas epigenéticas “lectoras” que contienen porciones denominada bromodominios (BRDs) (2). Dentro de la familia BET (*bromodomain-containing proteins*) es particularmente importante la isoforma BRD4, ya que sus inhibidores (entre los que se encuentra el compuesto JQ1) desactivan la transcripción del ADN (Figura 1b).

Los protooncogenes *MYC* codifican la síntesis de factores de transcripción que se unen al ADN para regular la expresión de múltiples genes implicados en la regulación del ciclo celular, la proliferación, diferenciación, apoptosis e immortalización. A finales de los años 1970 se descubrió la capacidad de las formas mutadas o amplificadas del tipo *c-MYC* (el más estudiado de estos protooncogenes) para promover muchas clases de cáncer. Sin embargo, debido fundamentalmente a que no se conoce ninguna porción estructural de la proteína *c-Myc* responsable del reconocimiento y enlace de ligandos, los esfuerzos realizados para descubrir fármacos que inhiban su acción carcinogénica han fracasado hasta el momento.

(a) Proteínas escritoras y borradoras



(b) Proteínas lectoras

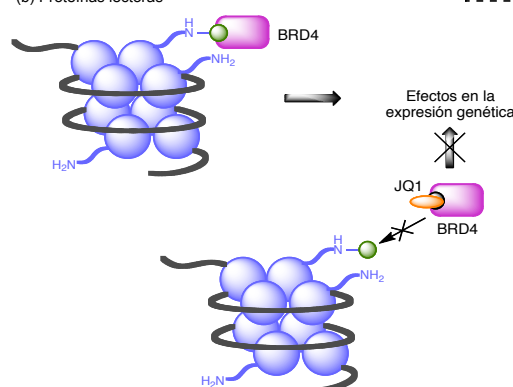


Figura 1. (a) Proteínas epigenéticas lectoras y borradoras. (b). Inhibición de la proteína epigenética lectora BDR4 por el compuesto JQ1.

James Bradner, un investigador del Dana-Farber Cancer Institute de Boston que es también Assistant Professor en la Harvard Medical School, ha demostrado en

fechas recientes que este objetivo puede lograrse de forma indirecta con inhibidores de la proteína “lectora” BRD4. Ésta reconoce e interacciona con residuos *N*-acetilados de lisina presentes en las histonas promoviendo el reclutamiento del factor B de elongación transcripcional positiva (P-TEFb), que es esencial para que la polimerasa

II catalice la elongación del ARNm implicado en la biosíntesis de la proteína *c*-Myc. Al impedir que los residuos de *N*-acetil-lisina de la cromatina sean “leídos”, los inhibidores BRD4 impiden la transcripción del ADN (ver una representación esquemática en la Figura 2).

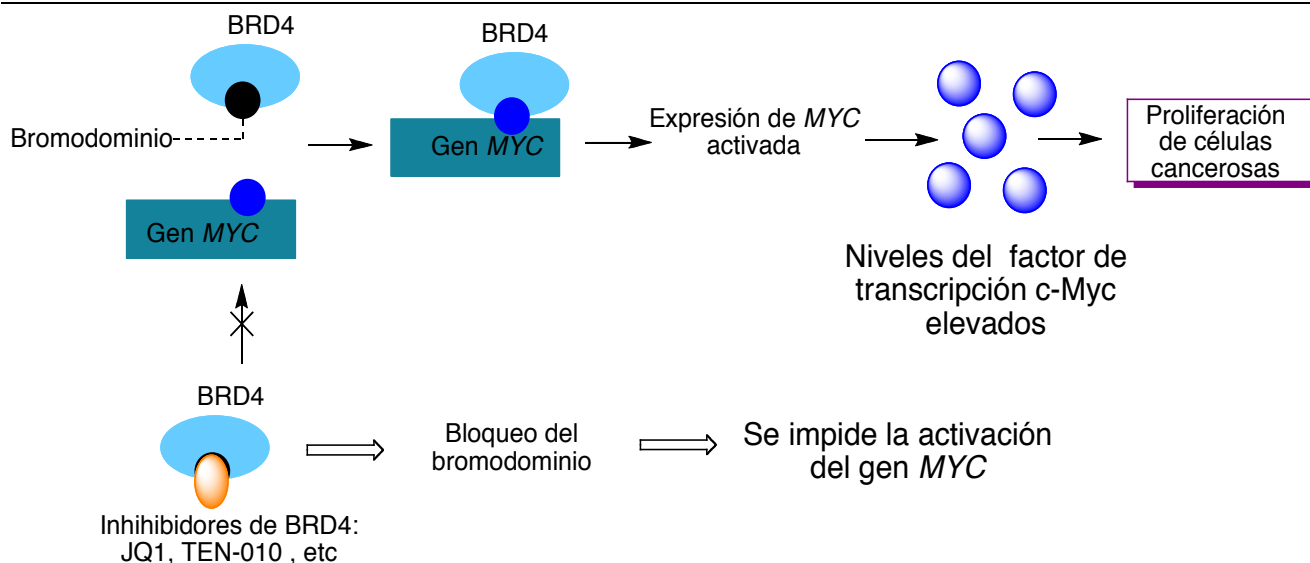
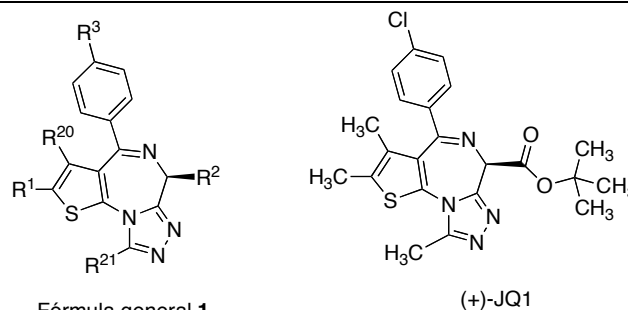


Figura 2. Los inhibidores de BRD4 impiden la activación de la expresión de *c*-MYC.

2. INHIBIDORES BET. DESCUBRIMIENTO Y MODO DE ACCIÓN DE (+)-JQ1 Y SUS ANÁLOGOS

El descubrimiento de fármacos epigenéticos está en su infancia y hay muy pocas herramientas biológicas y químicas, como anticuerpos de proteínas epigenéticas o inhibidores o activantes selectivos, para su estudio. Aunque el descubrimiento de los inhibidores BET fue fortuito, hoy se conocen varios peptidomiméticos, en su mayoría derivados de benzodiazepinas y tienodiazepinas (3), con esta actividad (4). Hay que recordar aquí que las 1,4-arenodiazepinas son “estructuras privilegiadas” que pueden actuar como miméticos de los giros β y hélices α de péptidos y proteínas.

Su descubrimiento surgió en el año 2011 cuando, tratando de identificar por cribado de alto rendimiento inductores de la expresión de apolipoproteína A1 (APOA1) potencialmente útiles en el tratamiento de la aterosclerosis, se observó que las moléculas activas se unían selectivamente a diversas proteínas BET (5). Anteriormente se había publicado que algunas tienotriazolo-1,4-diazepinas de fórmula general **1**, con actividad inmunomoduladora por inhibir el antígeno CD28 en las células T (6), se enlazan a BRD4 (7). Basándose en estos hallazgos, Bradner y colaboradores sintetizaron el compuesto JQ1, cuya enantiómero dextrógiro resultó muy selectivo para enlazarse a las proteínas con bromodominios BET (8).



Fórmula general **1**

(+)-JQ1

El interés de Bradner por la epigenética se había generado en una estancia postdoctoral que realizó en 2004 con Stuart Schreiber, cuyo grupo de investigación trataba entonces de encontrar inhibidores de unas proteínas “borradoras” que habían despertado gran interés como dianas de fármacos antitumorales: las desacetilasas de histonas (HDACs). De hecho, la FDA aprobó en el año 2006 vorinostat y romidepsina, dos de estos inhibidores, para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T.

Chris French, un patólogo experto en un cáncer humano escamoso muy agresivo denominado carcinoma de la línea media de la proteína nuclear del testículo (NUT) [*nuclear protein in testis* (NUT) *midline carcinoma* (NMC)], había demostrado en el año 2003 que este cáncer se produce por una translocación que origina el oncogén BRD4-NUT, cuyo producto actúa como una proteína “lectora” bloqueando la diferenciación epitelial y manteniendo a la célula en un permanente estado proliferativo. Como no se conocían inhibidores de proteínas “lectoras”, French y Bradner decidieron administrar vorinostat a un niño diagnosticado con este tipo de cáncer. Aunque el tumor parecía responder en un

primer momento, la toxicidad de este fármaco obligó a suspender el tratamiento. Fue entonces cuando, dado que BRD4 estaba implicada en este subtipo raro e incurable de carcinoma, enfocaron su atención hacia esta proteína como posible diana (9). Para encontrar ligandos con actividad óptima, el grupo de Bradner analizó las relaciones estructura-actividad de diversos compuestos y utilizó el modelado molecular basándose en la estructura cristalina del bolsillo de BRD4 al que se unen los residuos de *N*-acetil lisina de las histonas. Así se descubrió que el enantiómero (+)-JQ1, denominado así por haber sido sintetizado por el miembro del equipo de investigación Jun Qi, se enlazaba específicamente a BRD4 impidiendo que interactúe con dichos residuos. El compuesto (+)-JQ1 es una tieno-triazolo-1,4-diazepina sustituida en la posición C-6 por el grupo funcional carboxilato de *tert*butilo, que permite una fácil modificación y por tanto una mayor

diversidad en el caso de que ésta fuera necesaria. Este agrupamiento también disminuye el reconocimiento y el correspondiente enlace a los receptores de benzodiazepina del sistema nervioso central, aunque es responsable de que su vida media sea bastante corta.

La difracción de rayos X del complejo que forma (+)-JQ1 con BRD4 mostró que la porción de metiltriazol ocupa en un bolsillo hidrófobo el lugar de unión de acetil lisina (KAc). Los dos átomos de nitrógeno adyacentes del anillo 1,2,4-triazol mimetizan el grupo carboxamida y se unen a través de enlaces de hidrógeno al grupo NH₂ de la asparragina 140 y al grupo hidroxilo de la tirosina 97, en este caso a través de una molécula de agua, mientras que el sustituyente metilo del anillo de triazol se enlaza al lugar que ocupa el grupo metilo del acetilo (Figuras 3 y 4).

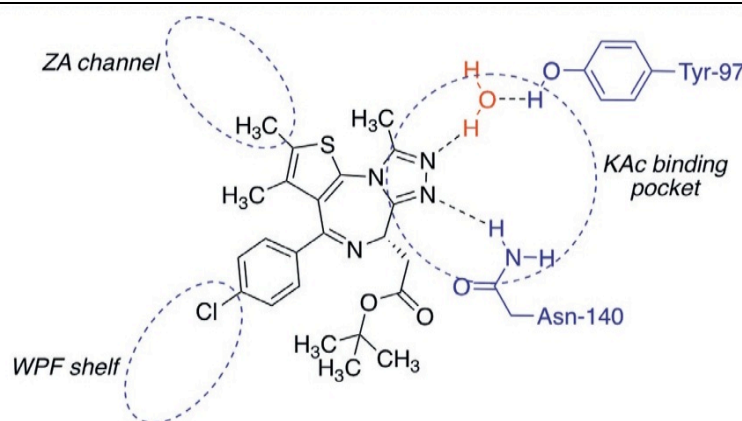


Figura 3. Representación esquemática de las interacciones de (+)-JQ1 con el lugar de unión de BRD4 y *N*-acetil lisina.

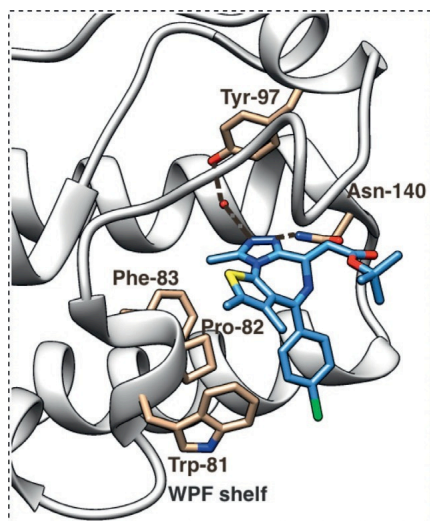


Figura 4. Estructura tridimensional generada por la base de datos Protein data Bank, referencia 3MXF, visualizada con Chimera 1.81.

En el otoño de 2011 los ensayos preclínicos demostraron que JQ1 induce la diferenciación y paraliza el crecimiento de células cancerosas procedentes de tejidos de un paciente con carcinoma NMC, ralentizando también el desarrollo de este tumor en ratones modelo. Más tarde,

también se demostró que JQ1 suprime la transcripción de *MYC*. Cuando se estudiaron sus efectos en células de leucemia mieloide aguda (AML) se observó que los niveles del gen *MYC* descendían rápidamente, la multiplicación celular cesaba y las células empezaban a diferenciarse (10).

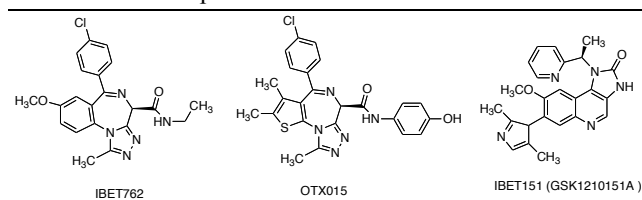
Además de su implicación en la AML, el funcionamiento de BRD4 es vital en el desarrollo de otros linfomas y mielomas (11). De hecho, las líneas celulares procedentes de muchos pacientes de mieloma múltiple son muy sensibles a (+)-JQ1, de forma que éste prolonga en un 50% la vida de ratones con este tipo de tumor. Además, dado que la unión de JQ1 a BRD4 atenúa la señalización que se origina en respuesta al daño en el ADN, se supone que JQ1 debe producir una acción sinérgica si se utiliza junto al inhibidor de proteasoma bortezomib aumentando su letalidad, lo que podría alargar la vida de los enfermos de mieloma múltiple otros 3-5 años (12). También puede ser útil en otros cánceres en los que la sobreexpresión de *c-MYC* juega un papel importante (13), como el cáncer de páncreas (14) y el carcinoma celular de Merkel (MCC), un tumor neuroendocrino de la piel muy agresivo que actualmente no tiene tratamiento (15). Recientemente se ha demostrado en células de osteosarcoma que los inhibidores BET actúan sinérgicamente con los inhibidores de cinasas

dependientes de ciclina e inducen apoptosis por un mecanismo independiente de *MYC*, suprimiendo el factor de transcripción *FOSL1* (16). También se sabe que BRD4 interacciona con el dominio *N*-terminal del receptor androgénico, y que la inhibición de BRD4 con JQ1 inhibe la actividad proliferativa e invasora de las células de cáncer de próstata resistente a la castración (17).

Los primeros hallazgos preclínicos obtenidos con JQ1 fueron la base para la creación de la empresa Tensha Therapeutics, que se dedica fundamentalmente a desarrollar inhibidores de bromodominios colaborando con distintos grupos de investigación. Esta empresa busca derivados de JQ1 que tengan minimizados sus efectos secundarios adversos y evite la aparición de resistencias, debidas sobre todo a los múltiples mecanismos por los que puede expresarse el gen *MYC*.

Un análogo de JQ1 denominado I-BET762 (GSK525762), desarrollado por GSK para el tratamiento de la sepsis (18), es un inhibidor BRD4 que se ensayó a instancias de Bradner en un paciente con NMC sin éxito, aunque la extracción de sus células tumorales y su posterior administración a ratones permitió disponer de un modelo animal de NMC. Es evidente que el hallazgo de un tratamiento para ese carcinoma es problemático, ya que su agresividad y la escasez de pacientes diagnosticados dificulta su reclutamiento para iniciar ensayos clínicos. Esta es la razón por la que se creó en 2011 un registro internacional de estos pacientes (<http://www.nmcregistry.org>). Aceptando la necesidad de administrar dosis mayores de I-BET762, o de combinarlo con otros fármacos, se inició en el año 2013 su desarrollo clínico ensayándose actualmente en diversos tipos de cáncer (ver: ClinicalTrials.gov identifier: NCT01587703).

Otros análogos estructurales de JQ1 son OTX015, que inhibe los bromodominios BET 2, 3, y 4 y se encuentra en ensayos clínicos de fases I/II contra diversas malignidades (19); I-BET151 (GSK1210151A), que reduce la expresión de los genes *MYC*, *BCL2* y *CDK6* y ha mostrado ser eficaz en animales modelo de leucemia de linaje mixto (MLL) (20); y TEN-010 (NCT-01987362), que inhibe BRD4 impidiendo su enlace al gen *MYC* y ha entrado en ensayos clínicos de fase I en pacientes con NMC o tumores sólidos avanzados. La estructura del último fármaco no se ha publicado hasta el momento.



3. OTROS BIOISÓSTEROS DE *N*-ACETIL-LISINA. DERIVADOS DE 3,5-DIMETILISOXAZOL

Los trabajos mencionados anteriormente demostraron que es posible inhibir con moléculas pequeñas el enlace al bolsillo KAc de los bromodominios, e impulsaron otras

investigaciones en este sentido. Así se descubrió que los compuestos derivados de 3,5-dimetilisoxazol-4-sustituído son también bioisómeros de *N*-acetil-lisina, y el análisis con rayos X permitió conocer cuáles son las interacciones responsables de su actividad y selectividad (21). En la Figura 5 se muestran esquemáticamente las interacciones del compuesto **2** con BRD4.

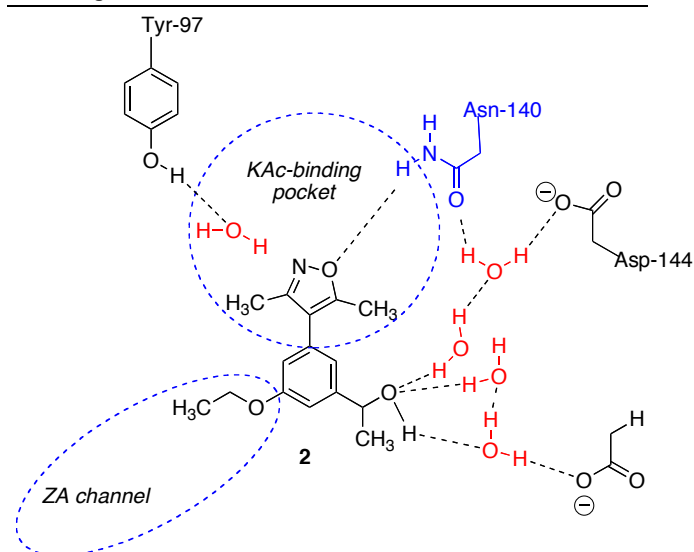


Figura 5. Representación esquemática de las interacciones del compuesto **2** y la proteína BRD4 humana.

La optimización de **2** por sustitución del grupo 1-hidroxietilo por diversos grupos arilmetanol y del grupo etoxilo por acetiloxi originó el compuesto **3**, que mostró una gran actividad antiproliferativa en una línea celular de leucemia mieloide aguda (22).

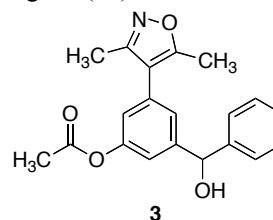


Figura 4. Estructura de teixobactina.

4. OTRAS POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS BET

4.1. Modulación de la respuesta inmune

Además de su potencial como fármacos antitumorales, los inhibidores BRD pueden ser de interés para la modulación de la respuesta inmune, ya que la inhibición de las señales inducidas por la interacción de estos bromodominios con la cromatina puede disminuir la expresión exagerada de proteínas inflamatorias. Ya hemos mencionado anteriormente que el compuesto I-BET762 es un inhibidor BRD4 desarrollado por GSK para el tratamiento de la sepsis. JQ1 también podría ser útil en el

tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por células T (23).

4.2. Contracepción masculina

Quizás porque es más fácil evitar la producción de un óvulo al mes en las mujeres que suprimir los millones de espermatozoides que producen los hombres diariamente, “la píldora” femenina se conoce desde los años 1960 mientras que los métodos para controlar la fertilidad en los varones son irreversibles, como la vasectomía, o inconvenientes. El desarrollo de una “píldora masculina” se ha dirigido hasta ahora fundamentalmente a terapias hormonales, que obviamente pueden tener efectos secundarios adversos. En este sentido hay que señalar que la administración de testosterona exógena disminuye la espermatogénesis a través de la inhibición *feedback* del eje hipotálamo-pituitaria-testículos (24).

Teniendo en cuenta que el bromodominio BRDT específico de los testículos (*bromodomain, testis-specific*), es esencial en la remodelación de la cromatina durante la espermatogénesis y es muy similar en cuanto a estructura y funciones al bromodominio BRD4, Bradner pensó que (+)-JQ1 podría ser interesante en la contracepción masculina, por lo que se puso en contacto con el Dr. Matzuk, un experto en reproducción del Baylor College of Medicine. El papel esencial de BRDT en la espermatogénesis está mediado por el primer bromodominio (BRDT1), el cual se enlaza a porciones *N*-acetiladas de la cola amino-terminal de la histona 4 (H4Kac4). En el año 2012 se comprobó que (+)-JQ1 es capaz de atravesar la barrera sangre-testículos e inhibir la actividad de BRDT1, disminuyendo la producción y la motilidad de los espermatozoides y produciendo un efecto contraceptivo reversible en animales de laboratorio (25). Los niveles de testosterona y el deseo sexual no se afectan, siendo el único efecto secundario observado una ligera pérdida de peso. Estamos pues ante un nuevo contraceptivo que tiene como diana a las células germinales masculinas, cruza la barrera sangre/testículos e inhibe la actividad del citado bromodominio en la espermatogénesis. Sin embargo, a pesar de la expectación provocada por esta posible aplicación de éste u otros inhibidores BRDT1, hay que insistir en que (+)-JQ1 no podrá emplearse como tal en clínica, y es previsible que sean necesarios varios años para encontrar un análogo útil que tenga como diana exclusiva dicha proteína. Además, la duda de si un hombre es capaz de acordarse de tomar una píldora todos los días a la misma hora está muy extendida.

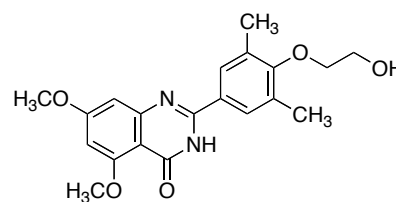
4.3. Actividad antiviral

(+)-JQ1 también se ha estudiado en infecciones causadas por el virus Epstein-Barr causante de varios tipos de cáncer (26) y como coadyuvante en el tratamiento del virus HIV-1 (27). En este último caso, se cree que el SIDA podría curarse en vez de tratarse como una enfermedad crónica debido a que JQ1 suprime los genes que activan a las células T y aumenta la actividad de la proteína Tat (*Trans-Activator of Transcription*) de dicho virus (28), por

lo que podría revertir la latencia del virus en terapias de combinación (29).

4.4. Fallo cardíaco

La proteína BRD4 también regula la expresión del gen que codifica el receptor de estrógenos α (30), y está implicada en la producción del fallo cardíaco debido a que las proteínas BET regulan el crecimiento de las células musculares activando un amplio conjunto de genes. En consecuencia, sus inhibidores podrían ser útiles en su prevención. De hecho, se ha demostrado que (+)-JQ1 disminuye el engrosamiento del epicardio, del miocardio y del endocardio, la formación de tejido cicatrizante y el fallo en el bombeo cardíaco en ratones modelo de esta enfermedad. RVX208 es un derivado de quinazolinona específicamente diseñado para este propósito que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase II (31).



RVX-208

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque la expectación producida por los inhibidores BET y sus potenciales aplicaciones, fundamentalmente para el tratamiento del cáncer, ha sido enorme, el conocimiento de este tipo de fármacos epigenéticos es aún escaso. Los inhibidores BET conocidos carecen de la especificidad necesaria para su aplicación clínica ya que pueden inhibir la expresión de múltiples genes, y para su aplicación en un tipo de cáncer concreto se necesitaría conocer en profundidad cuáles son los genes que se silencian (32). Tampoco se sabe aún si, además de las proteínas BET, hay otras proteínas “lectoras” cuya inhibición podría originar nuevos fármacos.

Expertos más críticos opinan que para avanzar más eficazmente en el tratamiento del cáncer, más allá del hallazgo de estructuras excitantes como JQ1, son necesarias moléculas que inhiban a los compuestos antioxidantes que se sintetizan en los tumores más avanzados e incurables, como es el caso de cáncer de páncreas (33). También sería de gran utilidad expandir las investigaciones para evitar la degradación de la proteína supresora de tumores p53, conocida como “guardián del genoma”, antagonizando por ejemplo la ubiquitina ligasa E3 denominada Mdm2 que está implicada en la degradación de p53 (34).

6. REFERENCIAS

1. Campbell RM, Tummino PJ. Cancer epigenetics drug discovery and development: the challenge of hitting the mark. *J Clin Invest* 2014; 124: 64-69.
2. Revisiones representativas: (a) Filippakopoulos P,

- Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Rev Drug Discov* 2014; 13: 337-56. (b) Gallenkamp D, Gelato K A, Haendler B, Weinmann H. Bromodomains and Their Pharmacological Inhibitors. *ChemMedChem* 2014; 9: 438-64. (c) Sánchez R, Meslamani J, Zhou MM. The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 676-85.
3. Para una revisión de derivados de diazepina inhibidores de bromodominios ver: Smith SG, Sánchez R, Zhou MM. Privileged diazepine compounds and their emergence as bromodomain inhibitors. *Chem Biol* 2014; 21: 573-83.
4. Avendaño C, Menéndez JC. Peptidomimetics in cancer chemotherapy. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 563-70.
5. Chung CW, Coste H, White JH, *et al.* Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains. *J Med Chem* 2011; 54: 3827-38.
6. Adachi K, Hikawa H, Hamada M, *et al.* inventors; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, assignee. Thienotriazolodiazepine compound and a medicinal use thereof. WO 2006129623 A1. 2006. Sept.
7. Miyoshi S, Ooike S, Iwata K, Hikawa K, Sugahara K, inventors; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, assignee. Antitumor agent. International patent PCT/JP2008/073864. 2009. Sept.
8. Filippakopoulos P, Qi PJ, Picaud S, *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468: 1067-73.
9. Maxmen A. Cancer research: Open ambition. *Nature News & Comment* 2012; 488: 148-50.
10. Zuber J, Vakoc C. RNAi screen identifies BRD4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2011; 478: 524-28.
11. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; 146: 904-17.
12. Los inhibidores del proteasoma aumentan los niveles de proteínas reguladoras, lo que conduce a la muerte celular por distintos mecanismos.
13. Floyd SR, Pacold ME, Huang Q, *et al.* The bromodomain protein BRD4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature* 2013; 498: 246-50.
14. a) Raza SS, Knab M, Chow Ch, *et al.* Development of resistance to BET bromodomain inhibitor JQ1 and demonstration of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *J Clin Oncol* 2014; 32 suppl, e15263. b) Kumar K, Raza SS, Knab LM, *et al.* GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1. *Scientific Reports* 2015; 5: Article number 9489. c) García PL, Miller AL, Kreitzburg KM, *et al.* The BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses growth of pancreatic ductal adenocarcinoma in patient-derived xenograft models. *Oncogene* 2015; doi:10.1038/onc.2015.126.
15. Shao Q, Kannan A, Lin Z, Stack BC, Suen JY, Gao L. BET protein inhibitor JQ1 attenuates Myc-amplified MCC tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2014; 74: 7090-7102.
16. Baker EK, Taylos S, Gupte A, *et al.* BET inhibitors induce apoptosis through a MYC independent mechanism and synergise with CDK inhibitors to kill osteosarcoma cells. *Scientific Reports* 2015; 5: Article number 10120.
17. Wen S-M, Quan Ch-Y, Jiang N, Shang ZQ, Niu YJ. What is the next generation therapeutic strategy for castration-resistant prostate cancer. *Asian J Androl* 2015; 17: 223-24.
18. a) Mirguet O, Gosmini R, Toum J, *et al.* Discovery of epigenetic regulator I-BET762: lead optimization to afford a clinical candidate inhibitor of the BET bromodomains. *J Med Chem* 2013; 56: 7501-15. b) Zhao Y, Yang Ch-Y, Wang S. The Making of I-BET762, a BET Bromodomain Inhibitor Now in Clinical Development. *J Med Chem* 2013; 56: 7498-7500.
19. Boi M, Gaudio E, Bonetti P, *et al.* The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clin Cancer Res* 2015; 21:1628-38.
20. Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, *et al.* Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* 2011; 478: 529-33.
21. Hewings DS, Wang M, Philpott M, *et al.* 3,5-Dimethylisoxazoles Act As Acetyl-lysine-mimetic Bromodomain Ligands. *J Med Chem* 2011; 54: 6761-70.
22. Hewings DS, Fedorov O, Filippakopoulos P, *et al.* Optimization of 3,5-dimethylisoxazole derivatives as potent bromodomain ligands. *J Med Chem* 2013; 56: 3217-27.
23. a) Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 2010; 468: 1119-23. b) Toniolo PA, Liu S, Yeh JE, *et al.* Inhibiting STAT5 by the BET bromodomain inhibitor JQ1 disrupts human dendritic cell maturation. *J Immunol* 2015; 194: 3180-90.
24. Para una revisión reciente ver: Kogan P, Wald M. *Urol Clin N Am* 2014; 41: 145-61.
25. Matzuk MM, McKeown MR, Filippakopoulos P, *et al.* Small-Molecule Inhibition of BRDT for Male Contraception. *Cell* 2012; 150: 673-84.
26. Palermo RD, Webb HM, West MJ. RNA Polymerase II Stalling Promotes Nucleosome Occlusion and pTEFb Recruitment to Drive Immortalization by Epstein-Barr Virus. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002334.
27. Banerjee C, Archin N, Michaels D, *et al.* BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. *Journal of Leukocyte Biology* 2012; 92: 1147-54.

28. Apolloni A, Hooker CW, Mak J, Harrich D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Regulation of Tat Activity Is Essential for Efficient Reverse Transcription and Replication. *J Virol* 2003; 77: 9912-21.
29. Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DIS, *et al.* Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest* 2015. doi:10.1172/JCI80142.
30. Nagarajan S, Hossan T, Alawi M, *et al.* Bromodomain Protein BRD4 Is Required for Estrogen Receptor-Dependent Enhancer Activation and Gene Transcription. *Cell Rep* 2014; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016>.
31. a) Picaud S, Wells C, Felletar I, *et al.* RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 19754-9. b) McLure KG, Gesner EM, Tsujikawa L, *et al.* RVX-208, an inducer of ApoA-I in humans, is a BET bromodomain antagonist. *PLoS One* 2013; 8:e83190.
32. Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJ. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med* 2012; 367:647-57.
33. Dhillon H, Chikara S, Reindl KM. Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicology Reports* 2014; 1: 309-18.
34. a) Sharma SK, Ramsey TM, Blair KW. Protein-protein interactions: lessons learned. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2002; 2: 311-30. b) Philpott M, Rogers CM, Yapp C, *et al.* Assessing cellular efficacy of bromodomain inhibitors using fluorescence recovery after photobleaching. *Epigenetics & Chromatin* 2014; 7: 14.



Contraceptives

Title in Spanish: *Anticonceptivos*

María Cascales Angosto¹

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

*Corresponding Author: cascales1934@gmail.com

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 3 (2015), pp. 221-223

Received: September 13, 2015 Accepted: September 13, 2015

Language of Manuscript: Spanish

El acelerado crecimiento de la población mundial en los últimos tres decenios ha dado lugar a la llamada «explosión demográfica». Las causas reales de este acelerado crecimiento se deben, por una parte, a la disminución notable la mortalidad infantil con el consiguiente aumento del número de personas que alcanzan la edad adulta apta para la reproducción, y por otra, al aumento significativo de la esperanza de vida. Por tanto, aunque la tasa de natalidad sea ahora menor, la cifra absoluta de habitantes de nuestro planeta crece de manera progresiva debido al aumento de la esperanza de vida. La tendencia actual de las poblaciones hacia su crecimiento es la consecuencia de los progresos y adelantos en la sanidad pública y de la mejora de la calidad de vida.

La anticoncepción (contracepción) es un medio universalmente aceptado para controlar la explosión demográfica. El término anticonceptivo se refiere a una serie de métodos artificiales u otras técnicas que previenen la concepción y el embarazo, bloqueando la fecundación mediante la interferencia con los procesos naturales de la ovulación, la fertilización y la implantación.

Aunque los procedimientos para evitar la concepción se han utilizado desde antiguo, los anticonceptivos orales que impiden la ovulación o anovulatorios hormonales fueron descubiertos en los años 50 del pasado siglo XX a partir de los trabajos de Gregory Pincus y otros investigadores del control de la fertilidad femenina, e irrumpieron en la sociedad en los años 1960. Fue entonces cuando aparecieron las *píldoras anticonceptivas*, siendo el Enovid la primera comercializada que consistía en una combinación estro-progestínica, de mestranol (150 µg) y noretindrona (10 mg). La composición de estas píldoras sufrió diversos cambios a lo largo del tiempo, sustituyendo el mestranol por el etinilestradiol, estrógeno sintético menos peligroso para las mujeres. La cantidad de etinilestradiol de 100 µg fue reducida a 50 µg y se añadieron otros compuestos como el levonorgestrel, progestina sintética que con el pasar de los años sirvió para elaborar la *píldora del día después*. A partir de estos cambios con el objetivo de mejorar su seguridad y tolerabilidad, la industria farmacéutica empezó a producir

las píldoras anticonceptivas de segunda generación bifásicas y trifásicas. Sin embargo, tanto las píldoras de primera como las de segunda generación provocaban efectos adversos, entre ellos complicaciones circulatorias. En los 1980 se llega a las de tercera generación, que se basan en otras progestinas, el desogestrel y el gestodeno, que sustituyeron al levonorgestrel. A través de este cambio se buscaba reducir los efectos no deseados en la mujer, por ejemplo el acné y el hirsutismo. Más tarde, una investigación de la OMS dio a entender que estas nuevas píldoras implicaban un peligro más elevado de coágulos sanguíneos (respecto de las píldoras de segunda generación), con lo que se generó un fuerte debate sobre el uso de las mismas. Existen otras consecuencias más o menos molestas, algunas de gravedad, en el uso de los distintos anticonceptivos hormonales: náuseas, hemorragias, dolores de cabeza, sequedad vaginal, etc. El uso de un tipo de píldoras puede evitar algunas de esas consecuencias pero no otras, mientras que otro tipo de píldoras tiene efectos negativos diferentes. Es casi siempre difícil encontrar anticonceptivos hormonales “perfectos” y adecuados para el gran número de las mujeres que deseaban evitar el embarazo y se encuentran en diversas situaciones de edad, peso, metabolismo, etc.

El método de anticoncepción de mayor efectividad, aunque irreversible, es la esterilización tanto femenina (ligación de trompas) como masculina (vasectomía). Entre los más seguros (sin efectos adversos), están los métodos físicos de barrera y el método de abstinencia en las relaciones sexuales durante la ovulación. Los métodos de barrera más comunes: preservativos, diafragmas, esponjas vaginales, etc., previenen que los espermatozoides alcancen el útero. Son seguros y cuando se utilizan unidos a espermicidas llegan a alcanzar un 100% de efectividad

Los anovulatorios hormonales, comentados anteriormente, que utilizan estrógenos y/o progesterona son efectivos, así como los anticonceptivos de emergencia o píldora del día después, que contiene también elevadas concentraciones de hormonas. Aunque parece que son bien tolerados, no pocas veces presentan efectos colaterales no deseados de variada índole, figurando entre ellos el riesgo

de alteraciones vasculares. Otros métodos anticonceptivos son los que utilizan dispositivos intrauterinos o intratubáricos, que impiden la fertilización y previenen la implantación del óvulo fertilizado. En general son bien tolerados, pero en algunos casos pueden causar problemas tales como la inflamación del endometrio

En la elección del método anticonceptivo tan importante es el criterio médico como la preferencia de los usuarios. Los factores a tener en cuenta respecto a la mujer son la edad, actividad sexual, su plan reproductivo, sus antecedentes patológicos y la actitud hacia la aceptación del método. Las características de un anticonceptivo ideal son: eficacia, contraindicaciones, que sean bien tolerados, que no afecten los deseos naturales, sin efectos adversos, económicos, fáciles de usar y de acción reversible. La elección de los anticonceptivos es fácil tanto para mujeres como para hombres. Entre las opciones disponibles para hombres están los preservativos, el *coitus interruptus* y la vasectomía. En el caso de las mujeres los métodos disponibles incluyen las píldoras orales, los inyectables, implantes, los dispositivos intrauterinos, métodos de barrera, espermicidas, los métodos naturales de planificación familiar y la esterilización quirúrgica.

En España el 79% de las parejas utilizan anticonceptivos. Entre ellos el método más utilizado es el preservativo con un 37 % de usuarios, seguido de la anticoncepción hormonal empleada por el 24 % de las encuestadas con claro predominio de la vía oral. En la actualidad se ha conseguido que estos anovulatorios, con dosis muy pequeñas de hormonas presenten una elevada efectividad. Sin embargo, la anovulación artificialmente mantenida durante mucho tiempo, no es del todo inocua para la mujer. Aunque en la mayoría de casos es bien tolerada, puede resultar peligroso emplearlos de manera indiscriminada durante largos períodos, por lo que se estima que es de suma importancia que los clínicos conozcan los riesgos que implica la anovulación así como el uso de determinados dispositivos intrauterinos.

En la actualidad un problema que resulta evidente es el embarazo precoz en adolescentes y sus consecuencias. Los profesionales sanitarios admiten que la sexualidad entre los adolescentes sigue siendo una asignatura pendiente. Las razones están en el orden biológico y social, entre las que se encuentran la tendencia en ambos sexos al inicio cada vez más temprano de las relaciones sexuales, unido a un bajo nivel de utilización de los métodos anticonceptivos. Todo esto va acompañado por una sociedad permisiva que acepta y favorece este tipo de comportamiento. Los adolescentes, ellas y ellos, aunque son biológicamente fértiles, no poseen el desarrollo adecuado para enfrentarse a responsabilidades tales como embarazos no deseados ni previstos.

Una solución a este problema ha sido la aparición de los anticonceptivos de emergencia “la píldora del día después”, una estrategia no del todo segura frente al embarazo indeseado con poca incidencia de efectos secundarios. Aunque existe una preocupación sobre los efectos adversos, varias organizaciones médicas han

solicitado facilitar el acceso de los anticonceptivos de emergencia para las adolescentes. Así, estos anticonceptivos pueden ser adquiridos en las oficinas de Farmacia de manera incontrolada (sin receta). Ante el temor de un embarazo no deseado después de una relación de pareja sin protección, estas mujeres casi niñas adquieren anticonceptivos de emergencia de manera reiterada y sin ningún control sanitario. Nos encontramos, por tanto, ante un problema importante: por un lado, acceso fácil al anticonceptivo para evitar el embarazo, y por otro, el descontrol que los efectos secundarios de dicho anticonceptivo puede causar a la adolescente si lo utiliza reiteradamente (como es el caso) y sin ningún control. Es necesario informar a la adolescente que los anticonceptivos de emergencia no se pueden utilizar como método anticonceptivo a largo plazo, que éste no es un sustituto de la anticoncepción habitual, y que su abuso incontrolado puede alterar el ciclo menstrual y provocar una serie de efectos adversos, como, náuseas (varía de 15 a 25%) y vómitos (de 1 a 5%). En 16% de los casos otros posibles efectos son sangrados, mastodinia, amenorrea, náuseas, cefalea, mareos, vómitos y mastalgia.

El papel del farmacéutico como profesional sanitario es informar sobre los beneficios y riesgos que los diferentes anticonceptivos presentan a corto y largo plazo. Los estudios sobre los efectos adversos mejor conocidos se refieren a los *anticonceptivos hormonales de primera generación*, que utilizaban dosis altas de estrógenos y progestágenos con efectos androgénicos y vasculares. En la actualidad, aunque se ha evolucionado hacia preparados con dosis más bajas de estrógenos, que han disminuido la incidencia de complicaciones graves, se siguen registrando una serie de trastornos que han de ser controlados por los profesionales de la salud. Las reacciones adversas más frecuentes, que en general desaparecen tras las primeras administraciones son: náuseas, mastalgias, aumento de peso, retención de líquidos, cefaleas, mareo o aturdimiento y sangrados irregulares. El mantenimiento de tales alteraciones obliga al abandono del tratamiento. Entre los *dispositivos intrauterinos* algunos han sido eliminados del mercado en los 1970 y 1980 cuando se encontró que producían efectos adversos tales como una elevada incidencia de enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico y aborto espontáneo.

Ante este importante problema de salud pública, que afecta a una parte importante de la población, la Real Academia Nacional de Farmacia, toma conciencia de ello y en fecha próxima ofrecerá un curso avanzado, dirigido a alumnos de nuestras universidades y a profesionales sanitarios, sobre: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA ANTICONCEPCIÓN.

REFERENCIAS

- Bahamondes L y Bahamondes MV (2014) New and emerging contraceptives: a state-of-the-art review. *International Journal of Women's Health* 2014; 6: 211-234.

Contraceptives

- De la Cuesta Benjumea R, Franco Tejada C y Iglesias Goy E. Actualización en anti-concepción hormonal. IT del Sistema Nacional de Salud. 2011; 35 (3): 201-208.
- Halpern V, Stalter RM, Owen DH, Dorflinger LJ, Lendvay A y Rademacher KH. Towards the development of a longer-acting injectable contraceptive: past research and current trends. *Contraception* 2015; 92: 3–9.
- Krolik M, Milnerowicz H (2012) The Effect of Using Estrogens in the Light of Scientific Research *Adv Clin Exp Med* 2012; 21: 535–543.
- Anticonceptivos hormonales combinados: conclusiones de la revisión del riesgo de tromboembolismo venoso, *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS. Información para profesionales sanitarios* 14 de octubre de 2013.



Pay attention: Do we really need an economical model based on knowledge?

Title in Spanish: *Llamada de atención: ¿queremos verdaderamente un modelo económico basado en el aporte de conocimiento?*

Ana M.^a Pascual-Leone Pascual¹

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

*Corresponding Author: anamariapascualleone@gmail.com

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 3 (2015), pp. 224-229

Received: November 14, 2015 Accepted: November 15, 2015

Language of Manuscript: Spanish

Estamos al final de una legislatura de gobierno difícil, en donde este país se ha visto abocado a una crisis económica mundial que, afortunadamente, ha capeado y soportado consiguiendo librarse de rescates europeos. Se nos habla de la mejora del nivel económico y de los niveles alcanzados, aunque, por otra parte, el Gobierno reconoce que aún falta mucho por hacer dado el nivel de desempleo que tenemos. Ello supone el reconocimiento de un problema no resuelto a nivel de la planificación de la economía nacional.

Se ha hablado mucho de I+D+i (investigación + desarrollo + innovación) (1,2) y se ha planteado continuamente, en ésta y en la anterior legislatura, crear las estructuras necesarias para un cambio en política económica basado en la innovación. Pero la innovación no se consigue sin creatividad, y la creatividad cultural, tecnológica o empresarial, estará siempre basada y sostenida en la investigación, de ahí el llamado I+ D + i, tan aludido en ambientes políticos, empresariales o tecnológicos. Por ello los investigadores claman y reclaman una apuesta política decidida y concretada de forma constante e intocable en los Presupuestos Generales del Estado Español.

Por otra parte, la investigación científica, de cualquier vertiente, se basa en la eficiencia y buen nivel de la educación de un país. Y también se reconoce, por parte de todas las instituciones y en las encuestas europeas de resultados educativos, las deficiencias de la educación en nuestro país. Quizá por ello nuestros continuos cambios de leyes educativas (3). Y, sin que por ello, la educación deje de ser, sin duda, otro problema básico y continuado en nuestro país. Además, es un problema denunciado reiteradamente, y sin ningún resultado, por personalidades culturales pertenecientes a Instituciones de excelencia. Antonio Muñoz Molina, escritor y Académico de Número de la Real Academia Española de la Lengua y Premio Príncipe de Asturias de las Letras en 2013, escribía recientemente en *El País*, el 24 de octubre 2015, un

artículo memorable, “Tierra Quemada”, donde puede leerse: *En las evaluaciones sobre estos últimos años nadie parece caer en la cuenta de la devastación que ha sufrido nuestro país en todo lo relacionado con la educación, la cultura y el conocimiento. En los programas electorales que van adelantándose en los simulacros de debates políticos de la televisión tampoco parece que haya sitio para reflexionar sobre esos problemas y ni siquiera para mencionarlos.* Este humanista (Jaén 1956) escribe: *En cualquier capital extranjera donde he estado en el último año me encuentro con los mejores entre los que si han aprendido: descubren la sorpresa de trabajar en atmósferas favorables a la investigación y al estudio, sin el castigo agotador de ir contracorriente; en la mayor parte de los casos aceptan con melancolía la evidencia de que, si quieren progresar en lo que hacen, el precio será no poder regresar. Grave es que los nativos tengan vedado el regreso, pero igual de grave es que no haya posibilidad de atraer el talento forastero.* Afirmación reciente y hecha por un humanista; “trabajar contracorriente” y que suscribiríamos todos los investigadores científicos de nuestro país actuales, y más aún los ya mayores que investigamos en circunstancias muy difíciles en la postguerra española (1).

Este escrito, desde una perspectiva humanista, denuncia los mismos hechos que los científicos hacen porque habla de CULTURA con mayúscula, que siempre es multidisciplinaria y que debería ser lo primero a tener en cuenta en los programas educativos de primera y segunda enseñanza en España. Y se deberían dejar los matices políticos, como se viene haciendo en las sucesivas leyes educativas, según el partido político que gobierne. El problema educativo no es político, es un problema colectivo y cultural de este país que solamente se resolverá oyendo a las gentes e instituciones culturales de mayor excelencia y a los educadores más competentes. La educación y sus programas no tienen que estar absurdamente sujetos a la política imperante. Sin embargo, en un mundo tan globalizado e intercomunicado como

éste, sí que habrá que observar y tener en cuenta a los sistemas educativos de los países culturalmente más avanzados. En el artículo señalado se exalta, una vez más, la contribución a la neurociencia de D. Santiago Ramón y Cajal y cómo se sirvió en su obra de sus dotes pictóricas y sus aficiones culturales y finalmente se afirma: *Que el legado de Ramón y Cajal permanezca arrumbado en un almacén es un síntoma de todo lo bajo que hemos caído*. Para nuestro problema educativo, habrá que afrontar de una vez la gran unión que existe, de forma inseparable, entre educación e investigación (3). Sin educación de alto nivel no surgirán motivaciones para la ciencia o se perderán muchas. Los investigadores reconocemos, con gran frecuencia, que no hemos sabido contactar con la sociedad civil y puede que sea cierto, ¿pero se educa a la gente para que medite y conozca la importancia de la ciencia en el siglo XXI? La historia de la ciencia debería figurar en los programas de enseñanza media y aún en las escuelas. Y no se deben rebajar las humanidades y la filosofía en los planes educativos básicos preuniversitarios porque forman parte del bagaje cultural que es necesario para despertar motivaciones intelectuales. Enseñan a pensar, ejercitan la imaginación, sin lo cual no se puede investigar.

Hay que hacer notar que en nuestro país el Ministerio de Educación se ha venido llamando desde 1977, Ministerio de Educación, Ministerio de Educación y Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Educación y Universidad, y Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, como se llama actualmente, en donde, curiosamente, el CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), pertenece al Ministerio de Economía y Competitividad que preside D. Luis de Guindos.

La educación y la investigación no deben, de ninguna forma, modularse y mezclarse con tintes políticos. Debe planificarse pensando solamente en la riqueza cultural que este binomio aporta y la importancia y riqueza que genera para construir una economía basada en el aporte de conocimiento. Como, indudablemente, se hace en países con gran nivel económico por tener, también, un gran nivel educativo e investigador. En Alemania el Ministerio se llama Ministerio Federal de Educación e Investigación. Buen nombre para reflejar lo que estamos diciendo.

Creemos que todas las Instituciones culturales de este país deben manifestarse unilateralmente y con presteza para poner de relieve las deficiencias de este binomio educación- investigación en un momento de cambio de la legislatura política el 20 de diciembre próximo.

Si hacemos historia, la revista trimestral de la Sociedad Española de Bioquímica de marzo de 2004, nº 139, dirigía entonces al futuro Presidente del Gobierno que saliera de las urnas el 14 de marzo de 2004 una carta abierta, y dedicó todo el número a remarcar la situación de la Investigación, centrándola sobre todo en la vertiente biomédica. Hace un balance de lo logrado en la legislatura que acababa y concretamente de las deficiencias habidas en la política científica del Ministerio de Ciencia y

Tecnología en el Gobierno presidido por el Sr. D. José María Aznar.

Se ofrecía un Pacto de Estado por la Ciencia y propuestas electorales en ciencia y tecnología por los distintos partidos políticos. Se remarcaban las deficiencias en personal dedicado a la investigación, en becas y en infraestructuras y la gran falta en nuestro país de aumentar el dinero dedicado a la investigación científica en los Presupuestos Generales del Estado, manteniendo, además, la asignación de forma permanente.

Desde el año 2004, el panorama de la investigación básica ha cambiado mucho, en gran parte por los aumentos presupuestarios económicos habidos en los años 2008-2009, podríamos decir que los lamentos de los investigadores dieron sus frutos. Además, el 2 de junio de 2011, en el Boletín Oficial del Estado pag.54387, se publicó la ley 14/2011 de 1 de junio de la Ciencia, Tecnología y la Innovación firmada por Juan Carlos I Rey de España. Dicha ley había sido ampliamente refrendada previamente en el marco parlamentario. En el preámbulo se dice: *La generación de conocimiento en todos los ámbitos, su difusión y su aplicación para la obtención de un beneficio social o económico, son actividades esenciales para el progreso de la sociedad española, cuyo desarrollo ha sido clave para la convergencia económica y social de España en el entorno internacional. Este desarrollo, propiciado en gran medida por la Ley 13/1986, de 14 de abril, de Fomento y Coordinación General de la Investigación Científica y Técnica, tiene ante sí en la actualidad el reto de la consolidación e internacionalización definitiva de la ciencia. Y en otro párrafo puede leerse: La Ley 13/1986, de 14 de abril, estableció la organización básica del Estado en materia de ciencia y tecnología, definiendo un instrumento principal de planificación estratégica: el Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. Y a través de este plan, lo digo como investigador del CSIC que yo era entonces, se creó la Comisión de Ciencia y Tecnología y los científicos pudieron presentar proyectos propios para su evaluación por primera vez.*

La nueva ley de 2011 viene a adaptarse a un país muy distinto con un gran desarrollo de las Comunidades Autónomas y con una plena integración en la Unión Europea. Además se desarrolla en un mundo absolutamente transformado por el avance de las nuevas tecnologías de comunicación, que están creando nuevas propuestas en un mundo totalmente globalizado.

En la nueva ley se intenta y se plantea la unificación de la carrera investigadora y la armonización con las distintas instituciones dedicadas a investigar, Universidades, Organismos Públicos de Investigación, Centros Sanitarios y Empresas. Así como Centros de Investigación de Comunidades Autónomas, Parques Científicos y Tecnológicos e Instalaciones Científico –Técnicas Singulares. En la disposición adicional duodécima se autoriza al gobierno para la creación de la Agencia Estatal de Investigación, orientada al fomento de la generación de conocimiento de todas las áreas del saber mediante el

impulso de la investigación científica y técnica, a la que será de aplicación la ley 28/2006 de 18 de julio de Agencias Estatales para la Mejora de Servicios Públicos. Esta Agencia, se dice, tendrá un plazo máximo de creación de un año, y aún no existe.

La publicación de esta Ley de Ciencia coincidía con la crisis económica mundial que sacudió nuestro país, y en noviembre de 2011 cambió el Gobierno. En la revista de la SEBBM de septiembre del 2015 nº 185, cuyo título reza “El proyecto político de la ciencia” se describe una panorámica científica muy distinta a la anteriormente expuesta en la revista de 2004. Se habla de las infraestructuras creadas, de los laboratorios ahora existentes con un nivel internacional de producción científica muy remarcable, en un mundo, además, en el siglo XXI, sumamente intercomunicado. Se dice que en Europa somos la quinta potencia económica pero solamente ocupamos el puesto diez y siete en cuanto a producción científica, ya que nuestra dedicación económica en los presupuestos del Estado para la investigación, progresivamente, han ido bajando desde el 2009, aunque siempre habían estado muy por bajo de la media europea. Y si nos referimos al puesto de España en el mundo nos colocamos hacia el puesto cuarenta.

En la revista de la SEBBM de septiembre del 2015 los titulares de los artículos hablan por sí solos. En la portada, de forma expresiva, se dibuja cómo la política y la investigación parecen ir en direcciones contrarias. En el primer artículo se comienza diciendo: *El sistema español de ciencia, tecnología e innovación está sometido, como no podía ser de otra manera, a los avatares de la profunda crisis económica que padece España desde al menos 2008. Siete larguísimos años que han acabado haciendo mella en todos y cada uno de los componentes de un sistema que, a fuer de ser sinceros, sobrevive y sigue expresando fortaleza pese a su fragilidad tradicional.* Desde la revista se han realizado una serie de preguntas a los diferentes partidos políticos intentando conocer las propuestas de ellos ante las inminentes elecciones al Senado y al Congreso de los Diputados. Han sido preguntados el Partido Popular (PP) y la revista titula su intervención resaltando lo esencial contestado, “Podemos competir con los mejores”, El Partido Socialista (PSOE) que la titula “Queremos promover un marco plurianual de inversión en I+D+i”, Convergencia Democrática de Cataluña (CDC) con titular “Es prioritario invertir en innovación para recuperar competitividad” y también de partidos emergentes como Podemos con titular “Hay que crear un sistema que invite a regresar a los investigadores exiliados”. Las preguntas realizadas a las formaciones políticas son sencillas: acerca de la dificultad en el sistema español de integrar a investigadores formados en el país dentro de nuestro propio sistema, o la posible, o no, especialización de las universidades en universidad docente y universidad investigadora, también sobre la no creación hasta el momento actual de la Agencia Estatal de Financiación como un instrumento independiente para la gestión de los fondos públicos dedicados a I+D que

figuraba en la Ley de 2011. Otra pregunta: ¿estaría el partido de acuerdo en blindar presupuestariamente la futura Agencia para evitar la injerencia de ciclos políticos y económicos? Y la revista concluye en conjunto y a falta del juicio de cada lector, una nota para las formaciones políticas que se mueve entre el aprobado justo y el suspenso.

La revista SEBBM pretende averiguar, puesto que el modelo de economía para España no parece resuelto, *si España quiere seguir creciendo a costa del turismo y la construcción, modelos frágiles y sobre los que apenas se puede incidir en un mundo actual globalizado o se apuesta por el conocimiento y una industria dotada de valor añadido.*

También se incluye un artículo de Nazario Martín presidente de la COSCE (Confederación de Sociedades Científicas de España), cuyas conclusiones no pueden ser más negativa: *“el sistema español de ciencia y tecnología vive una pendiente negativa”* o *“en nuestro sistema político, lamentablemente, la primera parte de la legislatura suele emplearse en dismantelar lo que ha hecho el gobierno anterior. Así no podemos seguir...”* La COSCE agrupa a más de 50 sociedades científicas en representación de 30.000 científicos españoles.

También se incluye un artículo de Xavier Pujol Gebelli, periodista científico, titulado ¿Diáspora científica?, en donde se lee: el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha perdido 4000 efectivos según datos de Carlos Andrada ex presidente de la COSCE y actual Rector de la Universidad Complutense de Madrid. También se citan declaraciones de D. Emilio Lora-Tamayo, Presidente del CSIC, en donde se manifiesta *que lo malo no es que se vayan sino que no tengan la posibilidad de volver.*

El panorama no puede ser más sombrío desde el punto de vista del proyecto político de la ciencia, en un momento en que la ciencia española ha demostrado en los últimos 25 años su pujanza, su nivel de publicaciones, y así comenzaba a ser reconocido internacionalmente. En 2011 el Gobierno de España lanzó el Programa Severo Ochoa con el objetivo de impulsar a los centros de investigación españoles que son, a nivel mundial, fuera de serie en sus respectivos campos. No más de 10 centros cada año -cuarenta hasta 2015- serían acreditados como Centros de Excelencia Severo Ochoa, reconociendo su valía y su capacidad de atraer talento. Siendo evaluados, además, a nivel internacional. Las instituciones seleccionadas serán dotadas de generosa financiación según noticias facilitadas por ICMAT, Instituto de Ciencias Matemáticas, uno de los centros seleccionados.

Todo ello viene a confirmar el nivel alcanzado por la ciencia española y cómo, de alguna manera, puede considerarse una potencia en ciernes. Muy bien está premiar y distinguir la excelencia pero ello no soluciona el problema prioritario político que debería ser la Ciencia Española en el siglo XXI.

A los investigadores que trabajamos en la postguerra española en un país destrozado económica y

emocionalmente, no nos extraña el éxito actual de nuestra ciencia porque en condiciones muy poco ventajosas comenzamos *el experimento* de levantar las redes de investigación que habían sido totalmente abatidas en nuestra guerra y sobre esas redes hemos llegado a donde estamos, sencillamente, porque los españoles somos sin duda un pueblo mediterráneo, imaginativo y con talento, contrariamente a lo que se pueda decir.

El problema está siendo poder trasladar el convencimiento de ello a la sociedad civil y a los políticos. La formación investigadora es lenta y la motivación del investigador ha de ser grande para trabajar en un país como el nuestro... Los investigadores tienen que ser batalladores al extremo. Y dado el panorama descrito anteriormente, quiero hacer mención de un debate cara a cara entre representantes actuales de políticos y científicos altamente cualificados que tuvo lugar el 30 de septiembre último. Un debate, creo, el primero cara a cara entre ellos, y cuyas conclusiones resultan muy esclarecedoras.

Se produjo organizado por la Sociedad Civil para el Debate, y fue presentado por el periodista Manuel Campo Vidal, periodista muy conocido en los medios y fue filmado con la colaboración de Indagando Televisión (Indagandotv), que se define como el canal de la ciencia y la innovación y está dirigido por la periodista científica Graziella Almendral. La Sociedad Civil para el Debate fue presentada por Campo Vidal como un movimiento civil que no es sostén ni portavoz de ningún partido político, y al cual ya se han adherido el Colegio de Abogados y el Colegio Oficial de Ingenieros de Obras Públicas y al que invitaba a cualquier Institución Universitaria o Cultural a adherirse. Dio las gracias a Graziella Almendral y a Indagando Televisión por su colaboración. Esta periodista terminó su corta y amable intervención diciendo “Sin ciencia no hay futuro y el futuro es la ciencia”. La noticia fue transmitida en los informativos de Telecinco, se habló del debate en las Mañanas de Cuatro, y se publicó en la web de Televisión Española.

Intervinieron representantes de seis partidos: PP, PSOE, UPYD, IU, Podemos y Ciudadanos. Se admite que en Europa, España ocupa el quinto lugar económico pero el diez y siete en potencial científico. Los representantes científicos fueron los Dres. José Manuel Pingarrón, Vicepresidente de la Sociedad de Química, Federico Mayor Menéndez, Catedrático de Bioquímica y Presidente de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), y Esteban Domingo, Profesor de Investigación del CSIC y ex presidente de la Sociedad de Virología.

Comienza Pingarrón con puntos concretos: nos estamos jugando el futuro, España es una potencia en Ciencia, pero pronto no lo será; más que mucho dinero se necesitan recursos humanos, ya que se admite que se han ido 11000 científicos, se necesita carrera científica estable y se reclama la Agencia Estatal para la Investigación que propone la ley de Ciencia de 2011. También estrategias a largo plazo para colaborativamente, aunar investigación universitaria y de las distintas instituciones del país. Mayor Menéndez se muestra de acuerdo con lo expuesto, habla de

la oportunidad del debate y dice, como el científico anterior, que se necesita que la ciencia sea una prioridad política, que se necesita compromiso de financiación estable, un calendario claro en las ayudas y que se cumpla; habla de la reciente carta abierta publicada en el número de la revista SEBBM de septiembre, firmada por los Socios de Honor de la sociedad, dirigida al Gobierno Central entrante el 20 de diciembre y al de los Autonómicos. Pide un programa claro consensuado para la ciencia, con cifras y compromiso. Esteban Domingo expone que los gastos para Defensa son dos veces los de Investigación y 3 veces los de Sanidad en los presupuestos del Estado. Dice que el genetista Francisco Ayala afirma que en USA se dedica el 3% a la ciencia pero ello constituye el 50% de su economía. Expresa que en la última crisis económica Alemania, Suecia, Canadá, Australia y USA aumentaron los fondos para investigación en vez de bajarlos, y Francia y Holanda no los bajaron. Expone que en Holanda los fondos para la investigación son cuatro veces los de Defensa. Termina afirmando *que un país no investiga porque es rico sino que es rico porque investiga*. Habla, también, de que hay estudios en distintos países que muestran la importancia de la ciencia como motor de la economía; publicaciones de la Unesco y el estudio Innove en Suecia. Finalmente, un investigador joven, Julio Rodríguez Lavado, que fue presentado como cofundador de Ciencia con Futuro, de la Universidad de Sevilla, afirma que es evidente que otros problemas como los desahucios o la violencia de género se han convertido en problemas de Estado porque ha habido una presión de la sociedad civil que ha incidido sobre la clase política para que los incorpore en sus proyectos de gobierno pero no hemos sido capaces, prosigue, de que suceda con la Ciencia. Comenta que el CIS, Centro de Investigaciones Sociológicas adscrito al Ministerio de la Presidencia, afirma que la ciencia no es una prioridad política a pesar de que los ciudadanos vienen valorando, en sus encuestas, en primer lugar a los médicos y en segundo a los investigadores.

Entre los representantes políticos, estuvieron: por el PP Javier Puente, portador de Telecomunicaciones en el Congreso que aduce que el gobierno se ha ocupado fundamentalmente de 3 vertientes: innovación, internacionalización y tecnologías. Habla de que se ha intentado apoyar el talento y se quiere incrementar el dinero para la Ciencia hasta al 2%; José Antonio Machado del PSOE, Senador socialista, afirma que el problema es que no ha habido verdadera política científica. Afirma que lo primero es volver a la financiación que había en 2009; segundo, reforzar los recursos humanos, ya que se han ido 11000 cerebros y que hay que poner condiciones para traerlos y para que funcionen bien los recursos que se consigan; crear la Agencia Española de Investigación, y crearla, dice, aunque cueste dinero. Emilio Criado, por Izquierda Unida, ha sido investigador del CSIC, es un claro defensor de la importancia de lo que se pide. Afirma que las PIMES, pequeñas y medianas empresas, prefieren comprar una patente que dar dinero para investigación y

habla de un escrito elaborado conjuntamente por Comisiones Obreras y UGT. Dice que no puede ser que Hawking, el gran físico británico, diga este verano en Tenerife que a los investigadores españoles les recomienda que se vayan a USA. Carlos Martínez Gorriarán, de UPYD, afirma que lo que se pide es de sentido común y que no es verdad que no haya dinero, lo que sucede es que defender la Ciencia, hasta ahora, no da votos a los partidos, y se muestra de acuerdo con lo denunciado. Pablo Echenique de Podemos comienza diciendo que la ciencia está de luto. Dice que están elaborando programas con soporte de gente autorizada. Habla del dinero que se dio a los bancos y afirma que conoce el tema porque es investigador. Finalmente, la representante de Ciudadanos, M^a Dolores González se muestra de acuerdo con las denuncias científicas y habla que ellos tienen proyectos científicos para la ciencia basados en los consejos asesores pertinentes porque creen que el proyecto de la ciencia forma parte de la solución económica de este país.

En el debate final se refuerzan los argumentos expuestos en ambos lados y se aduce, además, que en los Presupuestos Generales del Estado el escaso 1.2 % adjudicado a la investigación en España, cuando se analiza, resulta que no todo se invierte en ciencia, por ejemplo, parece que se incluyen partidas luego dedicadas a la fabricación de armas en Defensa, con lo cual el porcentaje realmente para investigación disminuye. También se menciona el dinero que deberían aportar las fundaciones privadas y las empresas para lo cual sería muy oportuna la Ley del Mecenazgo mencionada, pero nunca realizada. Los asistentes, sobre todo los partidos políticos, concretan que para convencer a la sociedad civil de la importancia de la Ciencia se debe aumentar la divulgación científica.

REFLEXIONES FINALES

Desde luego este país, como todos en el siglo XXI, en que la ciencia es una parte importante de la Cultura, debe efectuar una divulgación científica lo más rigurosa, de alto nivel y, además, lo más actualizada posible que pueda, y grandes esfuerzos para ello realmente se hacen en Centros de Investigación, en el CSIC, y en todas las Instituciones Culturales, por citar algunas: Colegio de Eméritos, en todas las Reales Academias e, incluso, en Fundaciones privadas como la Fundación Areces y que, además, son hoy retransmitidas por internet y quedan en las respectivas páginas web, pero si no está la sociedad debidamente y a buen nivel educada y, por ello, no siente ninguna necesidad cultural, la pregunta es: ¿servirá para algo esa divulgación científica?... y nos volvemos a encontrar con el binomio educación-investigación ya remarcado y que parece indisoluble.

Este país necesita con urgencia, desde luego, una prioridad política por la ciencia ya que podría ello, sin duda, ayudar enormemente a la solución del futuro económico del país, y conjuntamente y a la vez, sentar las bases de forma troncal y estatal de un buen proyecto de educación consensado y estable con todas las

Comunidades Autónomas. Y que, además, haya sido realizado teniendo en cuenta la educación impartida en los países más cultos del mundo. Cosa hoy muy factible por la gran comunicación y globalización que existe.

La Educación, como la Sanidad, deberían tener un tronco y un contenido inalterable, consensado por las distintas Comunidades que luego se adaptara levemente a ellas por la existencia de necesidades verdaderamente demostrables. Ello lo exige el mundo globalizado del siglo XXI.

Como muestra de ello y coincidiendo con el cambio de milenio; primero en 2010 y luego en 2015, científicos de excelencia de países del mundo han creado la Academia Global Joven (Global Youth Academy, GYA) en Berlín (4) con fondos, en principio, del Ministerio Federal de Educación e Investigación alemán, ya que la idea es alemana. A esta Academia perteneces ya 55 países entre los más cultos y también pertenecen algunos menos desarrollados. Para formar una red que englobe a las posibles Academias jóvenes de los distintos países tratando, entre otros fines, que no se pierda en este mundo, cada vez más intercomunicado ningún talento ni motivación cultural en el planeta. Desde siempre, 2010 y 2015, se han dirigido al Instituto de España y no a las clases políticas. Quieren cultivar tanto en la mundial GYA, como en las Academias Jóvenes Nacionales: la intergeneracionalidad, la intermultidisciplinariedad y la internacionalidad. También es uno de sus fines recoger y dar ideas para las políticas educativas mundiales implicando en ello las ideas y creatividad de jóvenes de excelencia. Grupos de trabajo de las Reales Academias de Ciencias y de Farmacia, a través del Instituto de España, han colaborado, de acuerdo, por supuesto, con sus respectivos Presidentes, en la elaboración de la Academia Joven de España junto con los cinco jóvenes científicos españoles que ya pertenecen a la GYA (4). Los estatutos de la Academia Joven Española y la documentación pertinente fueron depositados en nuestro Ministerio de Educación en el mes de mayo de 2015 para iniciar el proceso de creación y siguen en trámite como la citada Agencia Estatal de Investigación.

Ello da idea, con hechos, de la globalización de la cultura y la educación que habrá, sin duda, en el mundo de este siglo XXI, y los países que no se den cuenta a tiempo, quedarán descolgados del resto.

En la Ley de Ciencia citada del 2011, que fue aprobada unánimemente en junio por todos los grupos parlamentarios, en la disposición decimocuarta, se incluyen entre los agentes de ejecución de la citada Ley, además de la Biblioteca Nacional o el mismo Museo del Prado y otros, a las Reales Academias y Academias Asociadas vinculadas con el Instituto de España, *teniendo la condición, se dice, de agentes de ejecución a los efectos de lo dispuesto en esta ley.*

Como Académico de Número de la RANF y como investigador de biomedicina del CSIC que ha dedicado su vida a la investigación científica durante casi cuarenta años, con todo respeto, hago una llamada de atención al

Llamada de atención: ¿queremos verdaderamente un modelo económico basado en el aporte de conocimiento?

reto grande que tiene planteado el nuevo Gobierno que salga de las urnas el 20 de diciembre próximo, con respecto al binomio educación-investigación. Porque con ser importante y urgente la ampliación de créditos por la ciencia o la creación de la Agencia Estatal de investigación con presencia de científicos en ella, lo peor es la falta de constancia en esos créditos y no haber tenido la vivencia nunca del daño y retraso que se produce con la inestabilidad y falta de perseverancia de las subvenciones. Por todo ello hago las siguientes preguntas ¿queremos verdaderamente un modelo económico basado en el aporte de conocimiento científico? y, conjuntamente, ¿queremos de una vez dar paso a la educación y la cultura con mayúscula?

BIBLIOGRAFÍA

1. Retroceso en el tiempo: la investigación biomédica en España. Testimonios y reflexiones lecturas para el futuro” Madrid. Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) 2012, 390 p.
2. Presentación del libro Retroceso en el tiempo: la investigación biomédica en España. An Real Acad Farm 2013; 79 (2): 308-330.
3. Ana Mª Pascual-Leone “Investigación –Educación y viceversa: la gran asignatura pendiente” Revista Panacea (humanidades, ciencia y sanidad) 2015; 4: 30-41.
4. “Academia Nacional Joven:¿vamos a dejar pasar el tren para España?” An Real Acad Farm 2014; 80 (1): 4-8.



Some thoughts on science

Title in Spanish: *Algunas reflexiones sobre la ciencia*

Santiago Cuéllar Rodríguez¹

¹Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid.

***Corresponding Author:** santiago.cuellar.rodriguez@gmail.com *An Real Acad Farm* Vol. 81, Nº 3 (2015), pp. 230-238

Received: September 27, 2015 **Accepted:** October 23, 2015

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Al leer cuidadosamente los artículos de las publicaciones *científicas* relativas a diversas áreas de conocimiento, no es difícil percibir discrepancias – algunas profundas – en cuanto al *sentido* que se da al término *ciencia*. De hecho, todos los que nos relacionamos con la actividad científica apelamos a sus *esencias*, pero no todos nos preocupamos por saber cuáles son, con lo que pasamos de *basarnos* en la ciencia a utilizar este término como una especie de *escudo protector* contra injerencias supuestamente profanas y, casi siempre, incómodas. Por todo ello, me permito proponer al lector algunas sencillas ideas, como punto de partida – pero no de llegada – de una reflexión personal.

Seguramente, encontraremos en la literatura científica y en filosofía cientos de definiciones del término *ciencia*, aunque la mayoría pueden encuadrarse en dos grandes grupos: las que se centran en el proceso de acumulación de conocimientos y las que se refieren fundamentalmente a la forma con que se adquiere un determinado conocimiento. Si hacemos caso a la definición de la Real Academia Española (RAE), la ciencia es un conjunto de conocimientos obtenidos mediante la observación y el razonamiento, sistemáticamente estructurados y de los que se deducen principios y leyes generales; también define como ciencia el saber o la erudición, e incluso la habilidad, la maestría o el conjunto de conocimientos en cualquier cosa. Es decir, la RAE destaca de la ciencia, sobre todo, el carácter acumulativo de conocimientos.

Sin embargo, cualquier persona que esté relacionado con la producción, utilización o divulgación científica echará de menos en la anterior definición la referencia a la forma y el método de cómo se obtienen esos conocimientos y su desarrollo ulterior; es decir, casi todos acordaremos que la ciencia implica tanto *adquisición sistemática* de conocimiento como su *acumulación organizada* y su *desarrollo evolutivo*.

A todo lo anterior cabe agregar un tercer elemento constitucional: la ciencia es una *referencia del conocimiento* o, al menos, de un cierto tipo de

conocimiento. Por ello, la ciencia es – debería ser – *pública*; es decir, accesible para cualquier persona suficientemente cualificada en la materia en cuestión, con la única exigencia de conocer el método científico estándar. También debería ser *concreta*, expresada en términos claramente definidos y no ambiguos; por ello, como dice Mario Bunge (1), la ciencia constituye una rebelión contra la vaguedad y la superficialidad del sentido común. Asimismo, debería estar *sujeta a una arquitectura simbólica específica y compartida* (matemática, química, etc.), independiente de la lengua particular de cada científico. Finalmente, la ciencia debe ser *objetiva*, es decir, ajena a ideas particulares.

Pero, tan importante como acordar qué es la ciencia es hacerlo sobre lo que no es. En este sentido, la ciencia:

- *NO es la opinión de una persona*, aunque sea experta en la materia en cuestión, y menos aún si es un charlatán. La opinión de un experto puede ser muy valiosa como orientación personal, pero una idea – aunque esté correctamente formulada – solo podrá alcanzar a ser el punto de partida de una hipótesis científica, pero para llegar a ser ciencia requiere muchos pasos adicionales. La credibilidad y la autoridad científica de los verdaderos expertos se fundamentan en el rigor científico de estos y no al revés.

- *NO es inmutable*; las leyes científicas evolucionan con el conocimiento teórico y el empírico, en la medida en que profundizan en la realidad.

- *NO es infalible*; una ley científica solo es válida temporalmente, hasta que se encuentren hallazgos contrastados que la contradigan; tan solo es la mejor explicación posible... hasta el momento.

- *NO es una ideología ni una religión*. La credibilidad de la ciencia se fundamenta en la aplicación estricta de un procedimiento sistemático y objetivo – o, al menos, intersubjetivo – de estudio, que implica la contrastación experimental de la hipótesis formulada. Los idearios políticos y los dogmas religiosos – a veces tan estrechamente relacionados – se apoyan fundamentalmente

en convicciones íntimas de carácter fundamentalmente subjetivo.

– *NO sirve para conocer cualquier tipo de realidad.* No todo el conocimiento posible es susceptible de ser integrado en la ciencia ni abordado por su método. Solo el reduccionismo más simple se obstina en empequeñecer el mundo para poder encastrarlo en su particular agujero; para el reduccionista solo existe lo que cabe en su estrecha percepción, convirtiéndose – en el sentido más *íntimo* del término – en lo que podríamos definir como un *creyente* de la ciencia. La ciencia no puede – ontológicamente – afrontar la globalidad de la realidad, porque su visión se basa en modelos que, aunque puedan ser muy complejos o muy útiles, simplifican – reducen – la realidad.

2. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL MÉTODO CIENTÍFICO

Formulado en términos muy elementales, el *método científico* es definido tradicionalmente como un procedimiento estandarizado de adquisición de conocimientos que utiliza básicamente cuatro pasos consecutivos – susceptibles de reiteración, lo que permite optimizar progresivamente el *proceso* – que pueden identificarse con los siguientes:

- *Observación de fenómenos* o, en ocasiones, en lugar de la observación – o además de ella – lo que hay es una idea deducida teóricamente a partir de otras. Todo ello desemboca en la *duda*, que induce una respuesta mental de carácter interpretativo.

- *Formulación de una hipótesis*, como un modelo que intenta explicar el fenómeno observado o justificar la consistencia real de la idea teórica.

- Realización de un *experimento* que permita confirmar la validez predictiva de la hipótesis formulada, utilizando unos procedimientos previamente contrastados que garanticen la máxima objetividad del experimento. Es particularmente importante su *reproductibilidad empírica*; es decir, la cualidad de producir los mismos resultados cuando se repite el experimento en las condiciones establecidas.

- *Formulación de una ley*, en el caso de que el experimento confirme las predicciones propuestas por la hipótesis. Para ello, es particularmente recomendable hacerlo mediante un sistema simbólico y estructural estándar apropiado– matemático químico, etc. – que permita integrarla en un modelo científico más ampliamente compartido.

Sin embargo, estas cuatro características básicas pueden resultar excesivamente genéricas y, además, olvidan o trivializan otros aspectos que muchos científicos consideran fundamentales, como los relacionados con la experimentación (*experimentalidad*), la formalización, la transparencia, la publicidad y la aceptabilidad.

La *experimentalidad* se refiere a la continuidad entre el proceso de observación y el diseño y la ejecución del experimento, para comprobar – o refutar – la hipótesis

propuesta. Con la *formalización* – incluyendo la *matemática* – se busca incluir los elementos observacionales dentro de un marco definido y aceptado mayoritariamente de leyes y teorías – es decir, un *paradigma* –, que debe expresarse con un lenguaje inequívoco, exento de particularismos culturales o sociales. Además, las observaciones, hipótesis, experimentos y lenguajes científicos deberían ser *transparentes, públicos y reproducibles*; es decir, deben ser claramente definidos, difundidos en medios de acceso generalizado y poder ser repetibles por cualquier persona cualificada con los medios y en las condiciones especificadas.

Otro de los pilares fundamentales que soportan el valor de la prueba de la evidencia científica – es decir, su *aceptabilidad* generalizada – es la *objetividad*, manifestada como la ausencia de prejuicios, sesgos de opinión o intereses espurios; sin embargo, la objetividad absoluta implicaría que el ser humano renuncia a su propia humanidad. Por eso, lo más próximo a la objetividad que hemos acertado a inventar es la *intersubjetividad*, la coparticipación y el consenso mayoritario de la comunidad científica a la hora de reconocer un procedimiento, un dato o una relación de causalidad. Bien es cierto que bajo el término de *comunidad científica* se camufla en ocasiones una oscura mezcla de personajes con intereses políticos, sociales y económicos determinados.

Finalmente, a todas estas características de la ciencia debería añadirse la de la *provisionalidad*; es decir, la argumentación teórica y la demostración experimental de todo procedimiento científico deben estar sujetas a una revisión crítica continua. Nada en la ciencia, ni en ninguna otra forma de conocimiento racional, debería aceptarse como definitivo.

3. PREJUICIOS EN LA CIENCIA

José Ramón Ayllón afirma que la ciencia no piensa (2). Efectivamente, la ciencia no piensa; pero los científicos sí piensan y sienten (piensan sentientemente, como el resto de los humanos, según Xavier Zubiri) y, por tanto, el desarrollo práctico de la ciencia está sujeto al mundo de las ideas y de los sentimientos de los científicos, y eso hace que nos adentremos en el proceloso universo de los prejuicios, de lo intensamente subjetivo y, en bastantes ocasiones, de los apañes interesados. Como dice Clive S. Lewis (3), lo que aprendemos de la experiencia depende de la clase de filosofía con la que nos aproximamos a ella; en otras palabras, cualquiera que sea el método o el objeto de un estudio o de una reflexión, existe un trasfondo que afecta al resultado final. Dicho trasfondo no es otra cosa que su punto de partida; es decir, los prejuicios del que está reflexionando.

Al utilizar aquí la palabra *prejuicio* no pretendo darle el sentido peyorativo con el que habitualmente utilizamos este término. Todos tenemos prejuicios y, de hecho, gracias a ellos podemos enfrentarnos eficazmente a la mayoría de las cuestiones cotidianas. Eso quiere decir, de momento, que no todos los prejuicios son intrínsecamente

malos; como indica el que fuera director del proyecto *Genoma Humano*, Francis Collins (4), el conocimiento mismo no tiene valor moral intrínseco, es el modo en el que ese conocimiento se pone en práctica lo que adquiere una dimensión ética. Hannah Arendt (5) decía al respecto que el hombre no puede vivir sin prejuicios y no solo porque su buen sentido o su discernimiento no serían suficientes para juzgar de nuevo todo aquello sobre lo que se le pidiera algún juicio a lo largo de su vida, sino porque una ausencia tal de prejuicios exigiría una alerta sobrehumana, aunque – como reconocía la propia Arendt – entre los motivos de la eficacia y de la peligrosidad de los prejuicios está el hecho de que siempre ocultan un pedazo del pasado. En definitiva, para lo bueno y para lo malo, los científicos también tienen prejuicios.

A veces, a esos prejuicios se les viste de gala y pasan a ser llamados *predisposiciones filosóficas, personalidad propia, carácter o substrato moral*. Pero, se quiera o no, son prejuicios, ya que generan una actitud específica previa; es decir, predisponen en un sentido determinado antes de que cada uno sea capaz de considerar los diferentes aspectos de cualquier idea o actividad que se plantee.

Puesto que los científicos, en tanto que personas con inteligencia sentiente, están afectados por los mismos prejuicios de base que afectan al común de los mortales, no están destinados específicamente – ni tienen un especial derecho o facultad – a formular visiones globales del mundo, sino tan solo de su propio campo, como recuerda Gustavo Bueno (6). Y cuando pretenden aplicar los conceptos categoriales, por rigurosos que sean en el ámbito de su esfera, a otros contextos, seguramente los distorsionarán y tergiversarán. Un siglo antes, Friedrich Nietzsche (7) ya condenaba a aquellos que, siendo expertos en alguna materia muy concreta, se atreven a dogmatizar sobre todo lo que se les pasa por la cabeza: *busqué grandes hombres, pero siempre encontré, únicamente, lacayos de su ideal*.

Por otro lado, tampoco es aceptable asumir como igualmente válida cualquier idea o hipótesis, sin atender a sus fundamentos, plausibilidad racional o coherencia. Esta mediocre forma de tolerancia intelectual acostumbra, como dice Aurelio Arteta (8), a ser hija de la pereza intelectual y hermana del prejuicio. Aquel que antes despreciaba cuanto ignoraba, hoy se ha convertido en un tolerante de lo mucho que desconoce y desconoce cuánto tolera; en definitiva, este tolerante de nuevo cuño muestra lo que no es otra cosa más que un síntoma de incompetencia intelectual. Y nadie ha demostrado que esta condición sea menos frecuente entre los científicos que entre el resto de los seres humanos.

4. EL FRAUDE CIENTÍFICO

Lo que podríamos llamar *prejuicios negativos* se han depositado en el fondo de nuestra mente de forma inadvertida, a través de la leche caliente que hemos ido mamando durante muchos años en nuestro ambiente familiar, académico, laboral y social. Serán o no

racionales, pero nunca son la consecuencia de nuestra reflexión y tal origen irreflexivo les hace prácticamente inmunes a la argumentación racional, lo que les hace particularmente persistentes. Sobre ellos descansan todas las formas de sectarismo racial, político, social, sexual, etc., pero, sobre todo, en ellos se fundamenta enteramente el comportamiento de los necios.

También en el ámbito de la ciencia los necios son legión y, como reconocía Albert Einstein (9), *la primacía de los tontos es insuperable y está garantizada para siempre; su falta de coherencia alivia, empero, el terror de su despotismo*. El propio Einstein reflexionaba sobre el auténtico papel de la ciencia, insistiendo en que *ésta solo puede afirmar lo que es, no lo que debiera ser*. Fuera de su ámbito, son necesarios los juicios de valor de todo tipo; el problema es que cuando los prejuicios negativos se combinan con la ausencia de perspectiva ética, es fácil acabar en los numerosos y monumentales fiascos que la historia de la ciencia ha contemplado. Con un par de ejemplos – elegidos de una lista lamentablemente larga, que no deja de crecer – pretendo ilustrar estos extremos.

A comienzos del siglo XX, la teoría de la evolución por selección natural ya gozaba de una aceptación generalizada por parte de los científicos, pero se habían encontrado muy pocos fósiles intermedios que enlazasen filogenéticamente los simios con los humanos, lo que permitiría establecer rigurosamente una línea evolutiva directa entre ellos; en definitiva, el codiciado *eslabón perdido*. Como es fácil entender en el contexto de aquella época, cualquier científico que lo encontrase, quedaría encumbrado y su fama sería impecable.

En 1912, Charles Dawson – un simple aficionado a la paleontología – afirmó haber encontrado un cráneo con características parecidas a las de los humanos modernos, pero con una mandíbula claramente relacionada con los simios. El descubrimiento tuvo lugar en Piltdown, Inglaterra, siendo presentado poco después al público en la Sociedad Geológica de Londres, con el apoyo explícito de importantes y reconocidos paleontólogos británicos de la época.

El fósil fue clasificado científicamente como *Eoanthropus dawsoni*, aplicándosele el término popular de *hombre de Piltdown*. Dawson pasó a convertirse en un personaje famoso y con él el orgullo nacional británico alcanzaba el éxtasis, al contar – por fin – con un fósil homínido importante en Gran Bretaña. A partir de entonces, los británicos ya podían competir con los alemanes, que *tenían* al Neanderthal, y los franceses, *poseedores* del Cro-Magnon.

Obviamente, durante los siguientes años paleontólogos y antropólogos continuaron localizando fósiles de homínidos primitivos en distintas partes del mundo, aunque el hombre de Piltdown no llegaba a encajar en ningún esquema evolutivo coherente con los nuevos hallazgos. Con el paso del tiempo, la disponibilidad de técnicas más rigurosas de análisis acabó poniendo las cosas en su sitio: la parte superior del cráneo del hombre de Piltdown correspondía a un humano moderno y la

mandíbula procedía de un orangután. Por si el ridículo ya fuera poco con esta estafa científica, además la mandíbula había sido manipulada – muy toscamente – para darle una apariencia similar a la que tenía el cráneo, lo que completaba la monumental burla. El engaño fue destapado en 1953, por lo que el *Eoanthropus dawsoni* y su descubridor anduvieron engañando al mundo más de cuarenta años, con el estúpido beneplácito de las instituciones científicas y académicas oficiales, y la ciega – y ufana – confianza de la propia sociedad.

El otro episodio ocurrió ya en pleno siglo XXI y tuvo que ver con uno de los temas más controvertidos de la investigación biomédica: la *clonación de seres humanos*. En 2004, Woo Suk Hwang, un veterinario surcoreano que era un perfecto desconocido en el mundo científico, publicó que había encontrado la manera de clonar seres humanos. Su trabajo constituyó nada menos que la portada del número correspondiente al 12 de marzo de 2004 de la revista *Science* (10), encumbrándose personalmente y enorgullecendo al pueblo de Corea del Sur por tener un compatriota de tamaño genio científico. Pocos meses después, científicos norteamericanos – que intentaron inútilmente reproducir los experimentos de Woo Suk Hwang – descubrieron que lo publicado por este científico coreano había sido una monumental patraña, plagada de burdas falsificaciones. Esto pone de relieve varias cosas: lo poco rigurosos que son algunos editores – aunque sean de publicaciones científicas de un prestigio tan grande como *Science* – cuando se trata de publicar grandes exclusivas, el nacionalismo irracional que está presente a flor de piel en la mayoría de las personas que no tienen nada mejor que ofrecer a la sociedad y la consideración de que todo vale con tal de hacerse famoso.

Decía Jean François Revel (11) que entre el error involuntario y el engaño deliberado se despliegan numerosas variedades de híbridos en que ambos se mezclan según todas las dosificaciones posibles. Nuestra mente está plagada de delicadas – a veces, imperceptibles – asociaciones de falsedad y veracidad; nuestra necesidad de creer es casi siempre más fuerte que el deseo de saber; nos escondemos a nosotros mismos la verdad para ganar confianza y así poderla negar delante de los demás; odiamos reconocer un error, salvo que podamos atribuirlo a nuestro exceso de celo. Pero, sobre todo, hemos cultivado la habilidad para desarrollar ideologías, esas pretendidas explicaciones de lo real que son construidas a base de escoger – o manipular – los hechos favorables a nuestras convicciones y rechazar los restantes.

Por supuesto, la evidente existencia del fraude científico no desvirtúa ni un ápice el extraordinario valor del método científico ni su aportación decisiva en el desarrollo del conocimiento y, en general, del desarrollo personal y social del hombre. Pero nos recuerda que las personas somos *frágiles* y que, de igual manera que somos capaces de conseguir grandes hazañas, también anteponeamos en demasiadas ocasiones la vanidad a la dignidad.

5. LOS MODELOS CIENTÍFICOS: DE LA ECONOMÍA A LA QUÍMICA

Paul Krugman (12), premio Nobel de economía, reconocía que casi toda la economía se basa en modelos; es decir, en versiones simplificadas de la realidad, a la que se pretende describir mediante procedimientos y construcciones matemáticas. Sin duda, un modelo económico tiene importantes virtudes, como facilitar el estudio detallado de diferentes escenarios socioeconómicos posibles y, supuestamente, mejorar el conocimiento y la predicción de la realidad económica, todo ello sin los riesgos que toda actuación real implica.

Sin embargo, pese a su utilidad en contextos muy específicos, los modelos económicos no han rendido resultados especialmente útiles para la mayoría de las personas, si se tiene en cuenta que los últimos doscientos años en los que la economía ha ido tomando cuerpo de ciencia, las crisis económicas globales se han ido sucediendo una tras otra de forma imprevista, a razón de una cada once años en término medio, como reconoce el propio Krugman. Cuando una determinada área socioeconómica – una ciudad, una región, un país o un conjunto de ellos con características más o menos homogéneas – cae en una recesión económica es cuando los modelos económicos chirrían: todas las teorías explicativas y predictivas funcionan muy bien hasta que hay que aplicarlas en la práctica, es decir, en la inexorable y polifacética realidad. El problema suele consistir en que los modelos frecuentemente están hechos a la medida de sus propios autores, de sus objetivos, de sus conveniencias... y de sus limitaciones; y eso es algo que raramente se confiesa.

Como dice Salvador Pániker (13), todas las teorías son invulnerables desde sus propios axiomas de referencia; eso nos facilita mucho nuestro trabajo investigador, porque tendemos a partir de los presupuestos que más nos convienen. Sin embargo, la realidad casi siempre nos impone muchas más variables que las que consideramos a la hora de desarrollar las ecuaciones de nuestro modelo. Además, solemos echar mano de soluciones previamente experimentadas – y fracasadas, muchas veces – para enfrentarnos a problemas nuevos, intentando inútilmente encontrar ciclos donde solo hay un desarrollo lineal, o viceversa.

Los economistas se defienden de su manifiesta incapacidad para prever los descomunales vaivenes de la economía, haciendo todo tipo de predicciones pero siempre procurando no discrepar con las de los más próximos o famosos. John Kenneth Galbraith, prestigioso economista – y propietario de un refinado sentido del humor –, se reía de sí mismo y de sus colegas afirmando que *los economistas somos especialistas en explicar concienzudamente por qué fallaron nuestras predicciones de forma tan estrepitosa*.

Para obviar el riesgo de la inmediatez, algunos echan mano con descaro del largo plazo, sin caer en la cuenta de que *a largo plazo... todos estamos muertos*, como decía

John Maynard Keynes (14); o se limitan a informarnos que la crisis ya ha pasado y que era *científicamente* imposible predecirla. Los economistas – decía Keynes – se plantean una tarea demasiado fácil, y demasiado inútil, *si en cada tormenta lo único que nos dicen es que cuando cede el temporal, el océano está tranquilo*.

Por supuesto, no propongo renegar de los modelos matemáticos en ningún área de la ciencia. Son una herramienta de estudio extremadamente útil, que nos permiten bosquejar la realidad, pero siempre y cuando no olvidemos que solo son eso: un croquis, una maqueta, una forma muy reducida – y por eso, más manejable – de representar la realidad. Sin embargo, la realidad tiene infinitas caras y aunque cada una de ellas es verdad, solo el conjunto de todas ellas adquiere el sentido último *la verdad*. Por el contrario, los modelos representan una única cara; es como pretender comprender la complejidad espacial de una esfera con su simple proyección bidimensional que hacemos al representarla en un papel.

Así pues, tanto lo bueno como lo malo de los modelos es que son fácilmente manejables. Son cómodos, seguros y fáciles de representar en un papel o en un ordenador... tan fáciles que muchos investigadores acaban cayendo en la tentación de adaptarlos a sus conveniencias personales, a veces creando verdades a base de promediar varias mentiras, o aceptando como leyes inexorables a cualquier hipótesis no comprobada, simplemente porque nos caiga simpático su autor, porque se adapte mejor a nuestras técnicas particulares o, simplemente, porque nos resulte más fácil de entender.

Solo la decisión de afrontar la comprensión profunda de la realidad nos puede salvar de morir aplastados por la simpleza de los modelos. Para ello, hemos de tener la suficiente humildad para intentar aprender aunque no seamos capaces de comprender, tal como nos ocurre durante la niñez. Como dice Ricardo Moreno (15), *la inteligencia para aprender es muy temprana, pero la madurez necesaria para comprender lo importante que es aprender es muy tardía*.

Volviendo a Krugman, éste insiste en la importancia de las acciones individuales de las personas en relación a la economía supuestamente planificada: *el caos no planificado de una economía de mercado está mucho más organizado que la planificación de una economía centralizada*. En una economía planificada – el modelo, por excelencia – casi todo está previsto teóricamente. Solo tiene un defecto: está al margen de la realidad, del mismo modo que lo está el médico que se empeña en prescribir dosis cada vez mayores de un medicamento que su paciente no va a tomar: no solo no resuelve el problema sino que acrecienta su ignorancia sobre el paciente y el coste del tratamiento. Como decía el propio Krugman (16), *los economistas saben el precio de todo y el valor de nada*.

Salgamos ahora de la economía y entremos en el mundo de la química, bastante más predecible que la anterior. Todo en química pivota en torno a un concepto fundamental: el *enlace*. En su concepción más elemental, supone la forma bajo la que dos átomos se unen para

formar una molécula o incluso cómo dos o más moléculas se asocian entre sí, tornándose – en general – más estables que sus precursores. En términos prácticos, consideramos al enlace como una realidad objetiva, porque nos resulta imprescindible y nos proporciona un alto nivel de predictibilidad de los resultados... a pesar de que nadie ha visto jamás un enlace químico. El caso es que la teoría química funciona excepcionalmente bien, hasta el punto de que es considerada como una de las áreas científicas en la que mayor convergencia existe entre la teoría y la experimentación. Pero, como admiten algunos de sus más reconocidos especialistas (17), la disciplina está, de hecho, entretejida de ficciones convenientes – pero cuestionables – como la electronegatividad, el estado de oxidación, el tautomerismo o la acidez.

La química puede ser explicada y aplicada de forma muy satisfactoria mediante una teoría global única, pero eso no es lo habitual en el ámbito científico. En casi todas las áreas de la ciencia nos encontramos con varios marcos teóricos compitiendo entre sí; unos se superponen, otros se contradicen y otras muchas no son más que diferentes expresiones de lo mismo. Como ya hemos visto, la elección del marco teórico tiene muchos componentes subjetivos y depende de factores tan poco científicos como la simplicidad, la plasticidad para explicar un proceso, las necesidades sociales de la comunidad y las manías particulares del investigador. Como decía Roald Hoffmann, premio Nobel de química, *cualquier definición rigurosa del enlace químico está condenada a ser empobrecedora; vale la pena divertirse con la riqueza difusa de la idea*. Esto es lo bueno que tienen los modelos.

6. VERACIDAD Y DEMOSTRACIÓN

José Ortega y Gasset (18) afirmaba que *las verdades teóricas no solo son discutibles, sino que todo su sentido y fuerza están precisamente en ser discutidas; nacen de la discusión, viven en tanto que se discuten y están hechas exclusivamente para la discusión*. Sin embargo, a algunos seres humanos no les interesa la verdad, ni la teórica ni la empírica, sino tan solo su verdad o, como mucho, una verdad que les resulte confortable.

Otros son algo más exigentes consigo mismos, aunque no reparan en la importancia que tienen los procedimientos a la hora de acceder a la verdad, y solo algunos son conscientes de que la verdad – la penetración multidimensional en la realidad – es un pozo insondable y nuestro conocimiento de ella siempre será necesariamente limitado. Para poder llegar a conocer un fenómeno, aunque sea de forma aproximada, lo que habitualmente hacemos es fraccionarlo y aislarlo del contexto, del resto de la red significativa. Es decir, realizamos un *análisis provisional*, descomponemos en partes ese trozo de realidad para poder acceder a lo profundo a ella, aunque casi siempre nos dejamos inadvertidamente muchos aspectos en el camino o simplemente las escondemos bajo la alfombra de nuestras teorías o de nuestros prejuicios, como hacen los malos limpiadores con la basura.

Una vez descompuesta en unidades comprensibles, nuestra mente ha de realizar el trabajo inverso, la integración de los fragmentos o *síntesis* para reincorporar de algún modo, aunque sea parcial, el contexto omitido. Sin embargo, nuestros sentidos y nuestros prejuicios conscientes e inconscientes afectan a la percepción de la realidad a través del análisis y esos mismos prejuicios afectan a la subsiguiente síntesis, como señala Claudio Gutiérrez (19).

Según una de las tesis de Immanuel Kant (20), la realidad en la que nos movemos y de la que formamos parte se basa en cualidades que pertenecen al entendimiento del observador; esa realidad no parece ser independiente del ser humano, del observador inteligente. Es decir, en cuanto perceptores del mundo, imponemos ciertos rasgos a toda nuestra experiencia. En realidad, prácticamente toda la obra de Kant es una refutación de la idea de que solo mediante la razón podemos descubrir la naturaleza de la realidad y, de hecho, su principal conclusión es que el conocimiento requiere tanto la observación sensorial como los conceptos que aporta el observador. Lo uno sin lo otro no sirven de nada, argumentaba Kant.

Uno de los grandes debates sobre el conocimiento es la relación entre la verdad – como representación válida de la *realidad total* acerca de algo – y la forma en que tal verdad puede ser confirmada. Sin embargo, la verdad no es algo que dependa de su demostrabilidad, entre otras cosas porque la verdad que el hombre llega a conocer es siempre una adaptación personal de esa verdad; una adaptación que, como mucho, podrá ser honesta y rigurosa, pero que no deja de ser particular. En esta línea de pensamiento se movía Werner Heisenberg (21), para quien *lo que nosotros observamos no es la naturaleza misma, sino la naturaleza expuesta a nuestro método de observación*.

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos en la actualidad, en opinión en algunos expertos como John P. A. Ioannidis (22), es que los falsos positivos y los resultados exagerados en los estudios científicos están alcanzando proporciones epidémicas. Posiblemente, el número de investigadores – y el de experimentos, observaciones y análisis que se hacen – ha aumentado de forma exponencial en todos los ámbitos y esto parece estar llevando a que la investigación científica esté cada vez más fragmentada, estableciéndose además una competencia feroz donde parecen pesar más los intereses individuales que los generales.

Esto último nos lleva al aspecto ético de la verdad, ya que, como indica Fernando Savater (23), el concepto de verdad no es solo el logro dialéctico que identifica la operación racional, sino también la clave de la constitución autónoma del hombre moderno como sujeto social; sin verdad, no hay auténtica educación. *Juan de Mairena*, el célebre personaje creado por Antonio Machado (24), afirmaba que lo corriente en el hombre es la tendencia en creer verdadero cuanto le reporta alguna utilidad, *por eso hay tanto hombres capaces de comulgar con ruedas de molino*. Pero este contradictorio personaje de ficción, tan

querido y próximo al propio Antonio Machado, se rebelaba contra la desesperanza de los que afirman que la verdad no existe: *quien afirma que la verdad no existe, pretende que eso sea la verdad, incurriendo en palmaria contradicción. Sin embargo, este argumento irrefutable no ha convencido, seguramente, a ningún escéptico, porque la gracia del escéptico consiste en que los argumentos no le convencen. Nunca un gran filósofo renegaría de la verdad si, por azar, la oyese de labios de su barbero*.

7. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA Y CONFLICTO DE INTERESES

Un gran número de investigaciones se acometen por razones diferentes a la búsqueda de la verdad y ello provoca que los llamados conflictos de intereses abundan y acaben influyendo en los resultados. En el ámbito de la investigación biomédica, por citar un ejemplo, buena parte de los estudios se realizan a instancias de empresas comerciales, dado el obvio interés económico de los resultados. Eso no supone, por supuesto, que este interés sea ilegítimo ni la investigación inútil, pero es evidente que los objetivos de la investigación son elegidos en función, fundamentalmente, de su potencial económico.

En el mundo académico, el éxito – y la supervivencia en los cargos – se mide a menudo por la publicación de datos favorables; por si fuera poco, a ello hay que añadir el auténtico oligopolio de las publicaciones de gran impacto. En definitiva, todo eso implica un efecto distorsionador sobre la financiación, las carreras académicas y el mercado. Hemos llegado al punto de que sean las industrias – de diferentes sectores – y los intereses de diferentes *lobbies* académicos los que determinen algunos programas públicos de investigación y las prioridades académicas de no pocas universidades, tanto públicas como privadas.

Nuestros políticos – da igual que sean los míos o los suyos, estimado lector – nos llevan distrayendo desde tiempos inmemoriales con la productividad de la investigación, con la necesidad del retorno de la inversión y con otras excusas por estilo que, a modo de *mantras*, utilizan para justificar el infame abandono de la investigación pública básica, auténtica fuente de ciencia y de tecnología, pero no en menor medida de riqueza cultural y económica de la sociedad. Bajo el pretexto de que la investigación es costosa – como si construir una autopista o una línea ferroviaria de alta velocidad no lo fuese –, recortan con morbosa frialdad los presupuestos públicos destinados a financiar la investigación básica, cuando el único desarrollo auténticamente sostenible solo puede basarse en el conocimiento; solo éste es capaz de generar campos nuevos, rescatar viejas cuestiones pendientes y resolver la ceguera de lo inmediato. En realidad, no hay nada más costoso – en todos los sentidos – que la ausencia de investigación.

Hay muchas personas que se sienten perfectamente cómodas con su ignorancia; lo único que les perturba es que alguien se lo diga y que no puedan defenderse con alguna explicación. Pero eso no es fácil que ocurra; es

sorprendente la energía que somos capaces de desarrollar para encontrar argumentos y datos que se adapten bien a cualquier predicción, por absurda que sea. Incluso hasta lo hacemos de forma inconsciente; nuestro cerebro es una increíble máquina para inventar explicaciones de hechos que no entendemos. Preferimos inventar a investigar, aunque exteriormente afirmemos muy ufanos que hemos llegado a nuestras conclusiones porque hemos reflexionado fríamente a partir de pruebas rigurosamente seleccionadas y testadas. Siempre estamos dispuestos a encontrar una explicación a cualquier fenómeno; lo último que nos atreveríamos a afirmar en público es que algo es impredecible. Sin embargo, muchas de las cosas importantes que suceden en nuestra existencia son completamente impredecibles desde nuestro conocimiento, como afirma Nassim Nicholas Taleb en su peculiar *El cisne negro* (25).

Los teoremas de incompletitud de Kurt Gödel nos muestran que hay verdades que se imponen, a pesar de la imposibilidad de su demostración. Específicamente, establecen que siempre hay afirmaciones que nunca se podrá demostrar que son verdaderas o falsas, sobre la base de un conjunto prefijado de axiomas; a partir de ahí, como decía Paul Davies (26), los seres humanos podemos descubrir verdades que un computador programado para trabajar con un conjunto predeterminado de axiomas nunca podría demostrar por sí solo.

Con la única ayuda de la razón, el hombre no es capaz más que de vislumbrar un universo borroso y preñado de hipótesis no verificadas, con una visión limitada, plana y ridículamente autosuficiente. Pretendemos ofrecer respuestas muy simples a preguntas que, en realidad, son extraordinariamente complejas; o, sencillamente, ignoramos las preguntas tachándolas de improcedentes o absurdas. En realidad, la duda siempre va más allá de la razón, la trasciende ontológicamente.

8. CIENCIA Y REALIDAD

Existen diferentes planteamientos sobre la relación que existe entre el conocimiento científico y la realidad. Van desde el *realismo ingenuo*, en el que los enunciados de la ciencia corresponden directamente a la realidad, hasta el *instrumentalismo puro*, donde los enunciados son meros artefactos descriptivos de los fenómenos.

Tal como decíamos algunos párrafos antes, la ciencia trabaja con modelos que, aunque muy útiles, son inevitablemente reduccionistas. Sin embargo, son los investigadores translacionales y los tecnólogos los que se encargan de transitar desde el conocimiento científico más general, básico o fundamental, hasta sus aplicaciones más concretas. En cualquier caso, lo que define claramente el método científico de otras formas de conocimiento es la experimentación y, sobre todo, la reproductibilidad de los resultados experimentales. Esto, que garantiza una extraordinaria firmeza y calidad al conocimiento alcanzado, es también un lastre notable que impide utilizar el método científico en múltiples áreas de la realidad. Y esto nos lleva a una cuestión de trascendental importancia:

no hay mayor rigor que conocer cuál es el límite de la validez de los métodos utilizados en el conocimiento y, en particular, en la ciencia.

La experimentación tiene una especial relevancia, en tanto que limita el poder de la subjetividad o, lo que es lo mismo, la prevalencia del observador sobre la propia realidad. Como indica Peter Watson (27), es esencial porque constituye una forma independiente y racional – y, por tanto, democrática – de autoridad. Sin embargo, la experimentación no siempre ocupa el mismo lugar cronológico en la evolución del conocimiento científico. Einstein formuló la teoría de la relatividad general sentado en su despacho de la oficina de patentes de Berna y de forma prácticamente exclusiva a partir de conceptos teóricos. No resolvió casi ningún problema experimental; de hecho, tuvieron que pasar bastantes años hasta que llegase la primera confirmación empírica de su teoría. El desarrollo de la mecánica cuántica, sin embargo, les vino impuesto a los teóricos por los impactantes resultados de los experimentos; ningún científico teórico en su sano juicio habría inventado la mecánica cuántica sin verse forzado a ello por los datos experimentales. Esto no impidió que se convirtiese en la teoría más exitosa de la historia de la ciencia (28).

Uno de los aspectos más sobresalientes de la ciencia durante los siglos XIX y XX, y desde luego, en el XXI, es su *matematización*. La formulación matemática de cualquier hipótesis o ley científica se hace cada vez más prolija e, incluso, llega a suplantar a la propia experimentación. A este respecto, Roger Penrose (29) – nada sospechoso de estar en contra de las matemáticas en ningún ámbito, dada su condición de físico teórico y matemático – decía que *la coherencia matemática está lejos de ser un criterio suficiente para decirnos si es probable que estemos en la pista correcta. Normalmente, las condiciones físicas tienen una importancia mucho mayor*. Como el propio Penrose indica, el progreso de la ciencia física se ha conseguido al encontrar el equilibrio correcto entre las restricciones, tentaciones y revelaciones de la teoría matemática, por una parte, y de la observación precisa de las acciones del mundo físico, por otra, normalmente mediante experimentos cuidadosamente controlados. *Cuando la guía experimental está ausente – como es el caso de la investigación fundamental actual – este equilibrio se rompe*, concluye Penrose.

Meinhard Kuhlmann (30) acusa a los científicos – en particular a los físicos – de hablar del mundo como si estuviese compuesto de partículas y campos de fuerza, pero sin dejar claro qué representan ambos conceptos. En su lugar, Kuhlmann propone que el universo podría consistir en colecciones de propiedades, como la forma y el color. De hecho, cada vez son más los que consideran que lo importante de la realidad no son las cosas en sí, sino las relaciones entre ellas. *¿Ha visto alguien alguna vez la masa en sí?*, se pregunta Kuhlmann. Y él mismo se responde diciendo que no, que solo observamos lo que la masa implica para otros objetos o, dicho de otra forma, cómo un cuerpo dotado de masa interacciona con otro por

medio de un campo gravitatorio local. Por ello, considera que la estructura del mundo, que refleja el modo en que las cosas se interrelacionan, constituye la parte más duradera de las teorías físicas. De hecho, en su opinión, tal vez convendría considerar las propiedades como la única categoría fundamental y, por ello, necesitamos combinar la física con la filosofía para obtener una imagen coherente del mundo físico. Pero, al fin y al cabo, es una opinión y, por tanto, no es ciencia.

Sin embargo, la opinión de Kuhlmann no es nada rara; en realidad, el pensamiento metafísico guió a muchos científicos de excepcional relieve, como Isaac Newton, Albert Einstein o Erwin Schrödinger.

9. VERDAD MATEMÁTICA

Una de las múltiples virtudes que tiene la matemática es que ayuda a descubrir verdades cuya existencia es independiente de las actividades de la propia matemática. Por este motivo, el concepto de verdad matemática no puede ser encapsulado en ningún esquema formalista, sino que su verdad real trasciende la de las simples construcciones humanas. Roger Penrose decía que, en tales casos, *la matemática tropieza con obras de Dios*.

Sea como fuere, el método matemático no puede ser reducido a una mera deducción lógico-formal de verdades, sino que pretende hacer que tal deducción se produzca en el seno de la realidad. Sin la realidad, no podría construirse la matemática y, de hecho, el realismo matemático es una de las principales implicaciones de los teoremas de incompletitud de Gödel, como afirma Guillermina Díaz (31). Es decir, los objetos matemáticos pertenecen al mundo real, no son meras construcciones mentales a la medida de las necesidades intelectuales humanas. Por ello, son solo accesibles a través de la unidad intrínseca de descubrimiento y creación.

Un ejemplo palmario de todo lo anterior son los archiconocidos – pero poco meditados – *teoremas de incompletitud o de indecibilidad de Gödel*. El punto de partida de Kurt Gödel fue una paradoja lógica: *este enunciado es mentira*. En realidad, el auténtico enunciado – sobre el que se basa todo lo demás – es un teorema que afirma: *este teorema no puede ser demostrado*. En concreto, el primer teorema de incompletitud de Gödel vino a demostrar que ningún sistema de axiomas matemáticos, por amplio y diverso que sea, puede ser lógicamente completo o, visto de otra manera, si las matemáticas son lógicamente consistentes, es imposible demostrarlo. En definitiva, algunos enunciados matemáticos no pueden ser demostrados ni refutados, simplemente son indecibles. Por ello, como indica Ian Stewart (32), los teoremas de Gödel implican que algunos de los problemas científicos actualmente no resueltos podrían no tener solución: *no son verdaderos ni falsos, sino que están en el limbo de la indecibilidad*.

Todo lo anterior nos lleva a que la realidad es el fundamento de lo posible, y no al revés. Por ello, la realidad matemática es previa a la lógica y de mayor amplitud que ésta, como demostró Gödel. Dado que

ningún conjunto de caracteres que pretenda definir una cosa agota la realidad de ésta, el conocimiento matemático también resulta una cuestión abierta, opuesta a cualquier forma de dogmatismo; como afirmaba Guillermina Díaz (33), cuando la matemática se establece como una cárcel de la realidad, la matemática pierde por completo todo su sentido. Es la misma naturaleza la que nos toma de la mano y nos muestra el perfil matemático que un matemático puro no habría visto por sus propios medios.

Un ejemplo paradigmático de lo anterior es la *teoría cuántica de campos*, fundamento del actual modelo estándar de la física. Como decíamos anteriormente, a ningún matemático se le habría ocurrido por sí mismo un desarrollo matemático de tales características, si la propia realidad no lo hubiera impuesto. Mientras que la realidad matemática es de naturaleza lógica, la realidad física está vinculada al universo en que vivimos y que percibimos mediante nuestros sentidos y tecnologías. Como indica David Ruelle (34), el pensamiento matemático no se basa necesariamente en el lenguaje, sino que emplea conceptos que pueden ser no verbales y asociados a elementos visuales, auditivos o musculares, aunque hay que reconocer que si no utilizásemos un formalismo específico y nos quedásemos exclusivamente con su significado intuitivo, es muy probable que las matemáticas habrían dejado de ser hace tiempo una forma y una herramienta de conocimiento, para convertirse en mera opinión o en un espectáculo poco exigente, que habría conducido a su estancamiento o incluso habrían desaparecido.

En definitiva, dado que las matemáticas son incompletas pero, al mismo tiempo, son el lenguaje natural de la ciencia, ello nos aboca inevitablemente a que siempre habrá elementos de la realidad que, siendo potenciales objetos de su estudio, van a quedar fuera del ámbito científico. Esto le lleva a Michio Kaku (35) a afirmar que no es posible una teoría que englobe todo el conocimiento científico (Teoría del Todo; *Theory of Everything, TOE*): *puesto que el teorema de incompletitud acabó con el sueño griego de demostrar todos los enunciados verdaderos en matemáticas, también pondrá a una teoría del todo más allá de nuestro alcance para siempre*.

También para Stephen Hawking (36) es posible que nos veamos obligados de emplear varias teorías diferentes en situaciones distintas para describir el universo y puede que cada teoría implique su propia versión de la realidad, sin que ninguna de ellas pueda arrogarse la cualidad de ser más real que las restantes. Como dice Hawking, *quizá sea esa la manera en que el universo hace las cosas*.

10. UNA CONCLUSIÓN... POCO CONCLUYENTE

De la misma forma que no deberíamos dar crédito a esos periodistas que tienen como máxima *que la realidad no estropee un buen titular*, tampoco deberíamos hacerlo con aquellos científicos que solo aspiran a *que la realidad no les estropee la simplicidad de una ecuación*.

11. REFERENCIAS

1. Bunge M. La ciencia. Su método y su filosofía. Editorial Penguin Random House, 2000.
2. Ayllón JR. Desfile de modelos. Análisis de la conducta ética. Ediciones Rialp, 1998.
3. Lewis CS. Los milagros. Ediciones Encuentro, 2009.
4. Collins FS. ¿Cómo habla Dios? Editorial Temas de Hoy, 2007.
5. Arendt H. ¿Qué es la política? Editorial Paidós, 2005.
6. Bueno G. ¿Qué es la filosofía? Editorial Pentalfa, 1995.
7. Nietzsche F. Crepúsculo de los ídolos o cómo se filosofa con el martillo. Alianza Editorial, 1998.
8. Arteta A. Tantos tontos tópicos. Editorial Grupo Planeta, 2012.
9. Einstein A. Mis creencias. Editorial Grupo ZAVA, 1984.
10. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*. 2004; 303(5664): 1669-74. Erratum in: *Science*. 2005; 310(5755): 1769. Retraction in: Kennedy D. *Science*. 2006; 311(5759): 335.
11. Revel JF. El conocimiento inútil. Editorial Espasa Calpe, 2007.
12. Krugman P, Wells R, Olmeyer ML. Fundamentos de economía. Editorial Reverté, 2008.
13. Pániker Alemany S. Ensayos retroprogresivos. Editorial Kairós, 2012.
14. Keynes JM. Breve tratado sobre la reforma monetaria. Editorial Fondo de Cultura Económica, 1992.
15. Moreno R. Panfleto antipedagógico. Editorial Leqtor, 2006.
16. Krugman P. ¡Acabad ya con esta crisis! Crítica, Editorial Grupo Planeta, 2012.
17. Ball P. Beyond the bond. *Nature*. 2011; 469(7328): 26-8. DOI: 10.1038/469026a
18. Ortega y Gasset J. La rebelión de las masas. Editorial Espasa, 2005.
19. Gutiérrez C. Conocimiento científico y sentido común. En: *Nueve ensayos epistemológicos*. Editorial Costa Rica, 1982.
20. Kant I. Crítica de la razón pura. Editorial Clásicos Bergua, 1970.
21. Heisenberg W, y otros. Cuestiones cuánticas: escritos místicos de los físicos más famosos del mundo. Ed. Ken Wilber. Editorial Kairós, 2007.
22. Ioannidis JPA. Una epidemia de falsos positivos. *Investigación y Ciencia* 2012; mayo, p. 39.
23. Savater F. La vida eterna. Editorial Grupo Planeta, 2010.
24. Machado A. Juan de Mairena. Editorial Cátedra, 1986.
25. Taleb NN. El cisne negro. Editorial Paidós, 2007.
26. Davies P. Dios y la nueva física. Editorial Salvat, 1994.
27. Watson P. Ideas. Historia intelectual de la Humanidad. Editorial Grupo Planeta, 2012.
28. Moyer M. ¿Es digital el espacio? *Investigación y Ciencia* 2012; abril, pp. 16-23.
29. Penrose R. El camino de la realidad. Una guía completa de las leyes del universo. Editorial Random House Mondadori, 2006.
30. Kuhlmann M. ¿Qué es real? *Investigación y Ciencia*. 2013; octubre, pp. 24-31.
31. Díaz G. Esbozo de una filosofía zubiriana de la matemática. *Actas del II Congreso de la Sociedad de Lógica, Metodología y Filosofía de la Ciencia en España*. Bellaterra, 6-8 de febrero de 1997, pp. 141-5.
32. Stewart I. Historia de las matemáticas en los últimos diez mil años. Crítica, Editorial Grupo Planeta, 2008.
33. Díaz G. Zubiri, Lakatos y la crisis godeliana del fundamento matemático. *Xavier Zubiri Review*. 1999; 2: 5-26.
34. Ruelle D. El cerebro de los matemáticos. Editorial Antoni Bosch, 2012.
35. Michio Kaku . Física de lo imposible. Editorial Debate, 2009.
36. Hawking S, Mlodinow L. La [escurridiza] teoría del todo. *Investigación y Ciencia*. 2010; diciembre, pp. 43-5.



Evaluation of ciprofloxacin and vancomycin bioactivity loaded in bone cements

Title in Spanish: *Evaluación de la bioactividad de ciprofloxacino y vancomicina incorporados en cementos óseos poliacrílicos*

Javier Martínez-Moreno^{1,2,3,*}, Virginia Merino^{1,2}, Amparo Nácher^{1,2}, Mónica Climente^{1,3}, José Luis Rodrigo⁴, Matilde Merino-Sanjuán^{1,2}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia. Valencia (Spain). ²Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Centro Mixto Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia (Spain). ³Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia (Spain). ⁴Servicio de Traumatología. Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia (Spain)

ABSTRACT: Antibiotic loaded bone cement used in prosthesis fixing, is a local release form that minimizes the prevalence and the complications that the antibiotics would unleash when administered intravenously. The aim of this work is to study *in vitro* release kinetics of ciprofloxacin and vancomycin loaded in different commercial cements and evaluate the bioactivity through a simulation exercise pharmacokinetics. Samples were prepared with commercial bone cement and ciprofloxacin and vancomycin hydrochloride (40:0,5:0,5). Release study were carried out under stirring in phosphate buffer, pH=7,4, for two months at 37°C. The antibiotic amount and elution rate, were compared using ANOVA. In order to study the bioactivity, Monte Carlo simulation was performed. The ciprofloxacin released from samples for 8 weeks was 0.29±0.06 mg from the Palacos® cements, 0.44±0.06 mg from LimaCMT1® and 0.18±0.04 mg from Simplex®. The vancomycin released for 24 hours was 0.34±0.17 mg from Palacos® cement, 0.68±0.16 mg from LimaCMT1® and 0.17±0.02 mg from Simplex®. After this time the release stopped. The simulation study shows that during the first 72 hours, the antibiotic coverage would depends on the bone cement, the sensitivity of the microorganism and postoperative day. At subsequence times, it is expected that local bioactivity increases.

RESUMEN: La inclusión de antibióticos en el cemento óseo destinado a la fijación mecánica de las prótesis constituye un sistema de liberación local de antibiótico que permite minimizar la prevalencia y la gravedad de las reacciones adversas que pueden desencadenar los fármacos cuando éstos se administran por vía sistémica. El objetivo del trabajo es estudiar el mecanismo y cinética de liberación *in vitro* de ciprofloxacino y vancomicina incorporados en diferentes cementos óseos comerciales y evaluar la bioactividad mediante un ejercicio de simulación farmacocinética. Se prepararon mezclas de los cementos de estudio con ciprofloxacino clorhidrato y vancomicina (40:0,5:0,5). Los estudios de liberación se realizaron en agitación continua en solución salina de tampón fosfatos, pH=7,4, durante dos meses a 37°C. El análisis estadístico de las cantidades de antibiótico liberadas acumuladas y las velocidades de elución se realizó mediante ANOVA. Con el fin estudiar la bioactividad, se realizó una simulación de Monte Carlo. La cantidad total liberada de ciprofloxacino en un periodo de 8 semanas fue de 0,29±0,06mg desde los cementos Palacos®, 0,44±0,06mg LimaCMT1® y 0,18±0,04mg Simplex®. La cantidad total de vancomicina liberada en 24 horas fue de 0,34±0,17mg desde el cemento Palacos®, 0,68±0,16mg LimaCMT1® y 0,17±0,02mg Simplex®. Transcurrido este tiempo la liberación cesó. El estudio de simulación, muestra que durante las primeras 72 horas, la cobertura antibiótica dependería tanto del cemento elegido como de la sensibilidad del microorganismo y el tiempo postquirúrgico. En tiempos posteriores, es de prever que la bioactividad local aumente.

*Corresponding Author: javigarvi@gmail.com

Received: Mars 12, 2015 Accepted: July 16, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 3 (2015), pp. 239-246

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La artroplastia de cadera/rodilla consiste en la cirugía ortopédica que reemplaza de forma total o parcial la articulación por un implante artificial llamado prótesis en aquellos casos en los que el daño de la articulación es irreversible. Una de las complicaciones más grave se asocia al desarrollo de alguna infección, que aunque

presente prevalencia entre el 0,5% y el 3%, en algunos casos puede ser de gravedad elevada y conduce al fracaso de la intervención, incluso en algunos casos puede desencadenar la muerte del paciente. Para prevenir la génesis de complicaciones asociadas al desarrollo de infecciones, se ha propuesto, desde hace algún tiempo, la inclusión de antibióticos en el cemento óseo destinado a la

fijación mecánica de las prótesis, ya que los sistemas de liberación local de antibiótico facilitan el aprovechamiento del fármaco, a la vez que reducen la prevalencia y gravedad de las reacciones adversas que pueden desencadenar los fármacos cuando éstos se administran por vía sistémica (1).

La combinación de antibióticos con los cementos poliacrílicos fue descrita por primera vez por Buchholz y Engelbrecht (2). Los numerosos y variados trabajos de investigación publicados en este contexto son contradictorios en cuanto a su capacidad de protección en la prevención de infecciones, debido a la incertidumbre existente sobre el posible desarrollo de resistencias a los antibióticos tras una exposición prolongada a bajas dosis de antibiótico, la eficacia y el coste de este sistema de vehiculización. A pesar de ello, la evidencia clínica indica que el uso de cementos cargados con antibióticos reduce significativamente el riesgo de infección (3); por ello, en la práctica clínica habitual se utilizan, aunque la cinética y el mecanismo de liberación de la mayoría de los antibióticos interpuestos en la matriz acrílica siguen siendo aspectos desconocidos. Las variables que influyen en el proceso de liberación del antibiótico desde el cemento son múltiples, entre ellas destacan cantidad y tipo de antibiótico incorporado al cemento (4, 5). En este sentido, resaltar que la velocidad de liberación del antibiótico desde el cemento (cantidad/tiempo) es mayor cuando se incorpora en forma líquida. Sin embargo, la utilización de formas líquidas en esta práctica clínica está limitada debido a su influencia negativa sobre las propiedades mecánicas de los cementos. Por el contrario, los fármacos en estado sólido tienen un efecto insignificante sobre la estabilidad mecánica de cemento óseo, siempre y cuando la proporción antibiótico/cemento se mantenga por debajo del 10%. La dosis de antibiótico a utilizar no queda totalmente establecida, varía según sea para el tratamiento o para la profilaxis; en el caso de perseguir el tratamiento terapéutico, se suele aconsejar adicionar 4 gramos de antibiótico a 40 gramos de cemento acrílico. Por el contrario, para conseguir un efecto profiláctico se recomienda utilizar dosis menores a 1 g de antibiótico por 40 g de cemento. Otro factor importante a tener en cuenta es el tipo y porosidad del cemento óseo y forma de preparación de la mezcla(6-9), ya que la porosidad del polímero facilita el acceso de los fluidos de disolución a la matriz del polímero y, en consecuencia, la liberación de los antibióticos a partir del cemento. Por otra parte, la porosidad está relacionada, en gran medida, con el mayor o menor volumen de aire atrapado durante la manipulación, mezclado y amasado de la muestra. De ahí que las cantidades de antibiótico liberadas desde el cemento puedan diferir según se empleen productos comerciales de cemento óseo impregnado de antibiótico premezclados o, por el contrario, se utilicen las preparaciones mezcladas de forma manual en el momento previo a la intervención quirúrgica.

Se han comercializado cementos poliacrílicos, de uso en artroplastias, cargados con antibióticos

aminoglicósidos, en particular gentamicina y tobramicina, y con antibióticos glucopéptidos (10), que han demostrado su utilidad clínica en términos de eficacia y seguridad del tratamiento. Sin embargo, el problema de su uso es que el número de cepas multirresistentes (10, 11), con capacidad de adherirse sobre el cemento, colonizándolo tras largos periodos de implantación se ha incrementado recientemente. De hecho, en el momento actual el incremento de resistencias de *Staphylococcus aureus* hacia los aminoglucósidos condiciona la eficacia terapéutica de este grupo de antibióticos. Se trata de una realidad preocupante, ya que el 30% de las infecciones de origen quirúrgico son causadas por la cepa *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM), lo que determina las estrategias para el tratamiento y prevención de las infecciones en las prótesis articulares (12).

En este contexto, se ha considerado oportuno estudiar la cinética de liberación de nuevos antibióticos incorporados a distintos cementos óseos comerciales y de esta forma obtener información relevante orientada a facilitar la selección del fármaco más adecuado en términos de eficacia y seguridad, ampliando así la disponibilidad de tratamientos utilizados en cirugía ortopédica.

El ciprofloxacino es una fluoroquinolona efectiva frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. La vancomicina es un glicopéptido sumamente efectivo frente a bacterias Gram-positivas. Ambos antibióticos se presentan en estado sólido, son estables a la temperatura de fraguado de los cementos y no alteran las características mecánicas de éstos, por lo que incorporados en cementos poliacrílicos son candidatos para su utilización en cirugía ortopédica (13).

El objetivo del trabajo que se presenta es estudiar el mecanismo y cinética de liberación *in vitro* de ciprofloxacino y vancomicina incorporados en proporciones profilácticas en diferentes cementos óseos comerciales y evaluar la bioactividad potencial de las mezclas mediante estudios de simulación farmacocinética.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El ciprofloxacino clorhidrato y la vancomicina han sido suministrados por Guinama (Valencia, España). De acuerdo con las especificaciones del proveedor ambos antibióticos cumplían las especificaciones marcadas por la Farmacopea Europea. Los cementos poliacrílicos Palacos® y Simplex® fueron adquiridos en Ibersugical (Valencia, España) y LimaCMT1® en Lima Implantes (Barcelona, España).

Las cantidades de antibiótico incorporadas al cemento se seleccionaron de acuerdo con las recomendaciones realizadas por diferentes autores (14-16) con la finalidad de alcanzar un efecto antibiótico profiláctico (1 g de antibiótico por 40 g de cemento).

Se preparó un lote de los cementos acrílicos Palacos®, Simplex® y LimaCMT1® con ciprofloxacino clorhidrato y vancomicina (40:0,5:0,5) siguiendo las instrucciones proporcionadas por los fabricantes. Las mezclas obtenidas

se introdujeron en moldes de teflón siguiendo la normativa ISO 5833-Anexo E, y se dejaron endurecer durante 24 horas. Previamente al ensayo de liberación, cada muestra se caracterizó en cuanto a peso, diámetro y espesor.

Los estudios de liberación del antibiótico se realizaron en un total de 9 muestras, 3 por cada cemento, manteniéndolas en condiciones de agitación continua en 10 mL de solución salina de tampón fosfatos, pH=7,4, durante 8 semanas en baño termostático a 37°C. A intervalos de tiempo preestablecidos, la totalidad de la solución tampón fue recogida y reemplazada por 10mL de tampón fosfato salino pH=7,4. Este proceso permite garantizar las condiciones sumidero, es decir que la concentración del fármaco en el medio nunca supere el 20% de su hidrosolubilidad. Las muestras experimentales extraídas a cada tiempo de muestreo se guardaron en una cámara frigorífica a 5°C hasta el momento de su cuantificación.

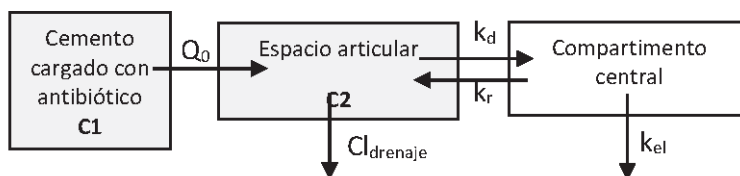
Para la determinación de ciprofloxacino se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV ($\lambda=254\text{nm}$). Para ello, se utilizó como fase estacionaria una columna Kromasil® C18 (150x4,6 mm) y como fase móvil una mezcla acetonitrilo y ácido acético 0,1M en proporción volumétrica 20:80 (V/V). La exactitud y precisión del método analítico se evaluaron con la determinación del error relativo y el coeficiente de variación intra-muestra (inferior al 2,4% y al 1,5%, respectivamente, en el ámbito de concentraciones estudiadas). La determinación de vancomicina se realizó mediante inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (ARCHITECT i1000SR) (17).

Las cantidades liberadas acumuladas, la velocidad de liberación y el logaritmo de la velocidad de liberación a

partir de las muestras de ciprofloxacino combinado con vancomicina se evaluaron mediante la prueba estadística ANOVA.

Para evaluar la bioactividad de los antibióticos en las muestras estudiadas se realizaron simulaciones de Monte Carlo. Se simularon para 100 pacientes las concentraciones de antibiótico en la zona local del implante a las 24, 48 y 72 h utilizando el programa informático NONMEM versión VII. Para ello, se utilizaron los parámetros característicos del proceso de liberación de los antibióticos obtenidos en el estudio *in vitro* y los parámetros fisiológicos de volumen articular ($1,6\pm 1,1\text{mL}$) (18) y aclaramiento local del fármaco, atribuido al drenaje de la herida a las 24, 48 y 72 h post-implante ($20,42\pm 11,3\text{ mL/h}$; $9,33\pm 11,02\text{ mL/h}$ y $4,11\pm 2,95\text{ mL/h}$ respectivamente) (19).

El modelo farmacocinético aplicado para realizar la simulación de concentraciones de antimicrobiano en biofase (Figura 1) consta de dos compartimentos; cemento cargado con el antibiótico (C1) y espacio articular (C2). La liberación del antibiótico se realiza desde el compartimento C1 mediante una cinética de orden cero regida por la constante de velocidad Q_0 (mg/h). A su vez, el fármaco se elimina desde el compartimento C2 mediante una cinética de primer orden regida por la velocidad de drenaje de la herida (mL/h). Puesto que durante las 72 horas posteriores a la intervención el drenaje es muy elevado, se ha considerado despreciable la distribución (k_d) y retorno del antibiótico (k_r) desde el espacio articular (C2) a la circulación sistémica y viceversa. Por ello, para obtener las concentraciones simuladas en el lugar del implante (C2) sólo se han considerado los compartimentos sombreados de la Figura 1.



Q_0 : velocidad de liberación del antibiótico desde el cemento (mg/h); Cl_{drenaje} : aclaramiento local del fármaco debido al drenaje de la herida (mL/h); k_d (h^{-1}): constante de distribución del antibiótico desde el lugar de implante al torrente circulatorio; k_r (h^{-1}): constante de retorno del antibiótico desde el torrente circulatorio al lugar de implante; k_{el} (h^{-1}): constante de velocidad de eliminación del fármaco

Figura 1. Modelo farmacocinético utilizado para calcular las concentraciones de antimicrobiano en el lugar de implante de la prótesis.

La evaluación de la bioactividad de las mezclas a los tiempos seleccionados se ha realizado utilizando los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de *S. aureus* Meticilin resistente (CMI= 0,5-2 mcg/mL)(20) y *S. Coagulasa Negativos -SCN-* (CMI= 0,25-1 mcg/mL) (20), gérmenes sobre los que la vancomicina muestra actividad, y de *S. aureus* (CMI= 0,12-0.5 mcg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (CMI= 0,25-1mcg/mL) y *E. Coli* (CMI= 0,004-

0,016 mcg/mL) (21), gérmenes sensibles al ciprofloxacino. Estos microorganismos han demostrado ser los responsables del 70% de las infecciones articulares desarrolladas en nuestro entorno (22). Se calculó para cada tiempo (24, 48 y 72 h) el porcentaje de pacientes cuya concentración de antibiótico en el lugar del implante (C2) sería superior a la CMI seleccionada.

3. RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran las cantidades de ciprofloxacino clorhidrato liberadas acumuladas durante 2 meses y las cantidades de vancomicina liberadas acumuladas hasta las 72 horas. Las cantidades de

ciprofloxacino y de vancomicina liberadas desde las mezclas de los antibióticos y el cemento LimaCMT1® fueron superiores a las cantidades de antibióticos liberadas desde el resto de mezclas estudiadas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Media y desviación estándar de la cantidad de ciprofloxacino y vancomicina (mg) liberados a los tiempos indicados desde los diferentes cementos poliacrílicos ensayados.

Tiempo (h)	Ciprofloxacino HCl						Vancomicina					
	Simplex®		LimaCMT1®		Palacos®		Simplex®		LimaCMT1®		Palacos®	
	MEDIA (mg)	SD	MEDIA (mg)	SD	MEDIA (mg)	SD	MEDIA (mg)	SD	MEDIA (mg)	SD	MEDIA (mg)	SD
24	0.134	0.018	0.318	0.032	0.209	0.045	0.174	0.021	0.659	0.141	0.339	0.166
48	0.144	0.019	0.351	0.044	0.229	0.047	-	-	0.677	0.161	-	-
72	0.144	0.022	0.367	0.050	0.235	0.047	-	-	0.681	0.162	-	-
1344	0.177	0.043	0.442	0.061	0.289	0.052	-	-	-	-	-	-

En la Figura 2 se representa la evolución de la velocidad de liberación de los antibióticos a partir de los cementos estudiados durante el desarrollo del ensayo. Los ensayos realizados con el ciprofloxacino muestran dos etapas; en la primera (primeras 48 h) la velocidad de liberación es rápida, y en la segunda la velocidad de liberación del antibiótico disminuye hasta que se mantiene en un valor constante. Por el contrario, los resultados obtenidos con vancomicina únicamente muestran una etapa, ya que durante las primeras 48 h del ensayo el

antibiótico se libera rápidamente, pero en tiempos posteriores la velocidad de liberación del antibiótico cesa. La comparación estadística del logaritmo de la velocidad de liberación de ciprofloxacino, obtenida para cada uno de los cementos estudiados, puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la primera etapa del estudio (primeras 48 h) a favor de LimaCMT1®, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en tiempos posteriores a las 48 h del ensayo en los tres cementos óseos estudiados.

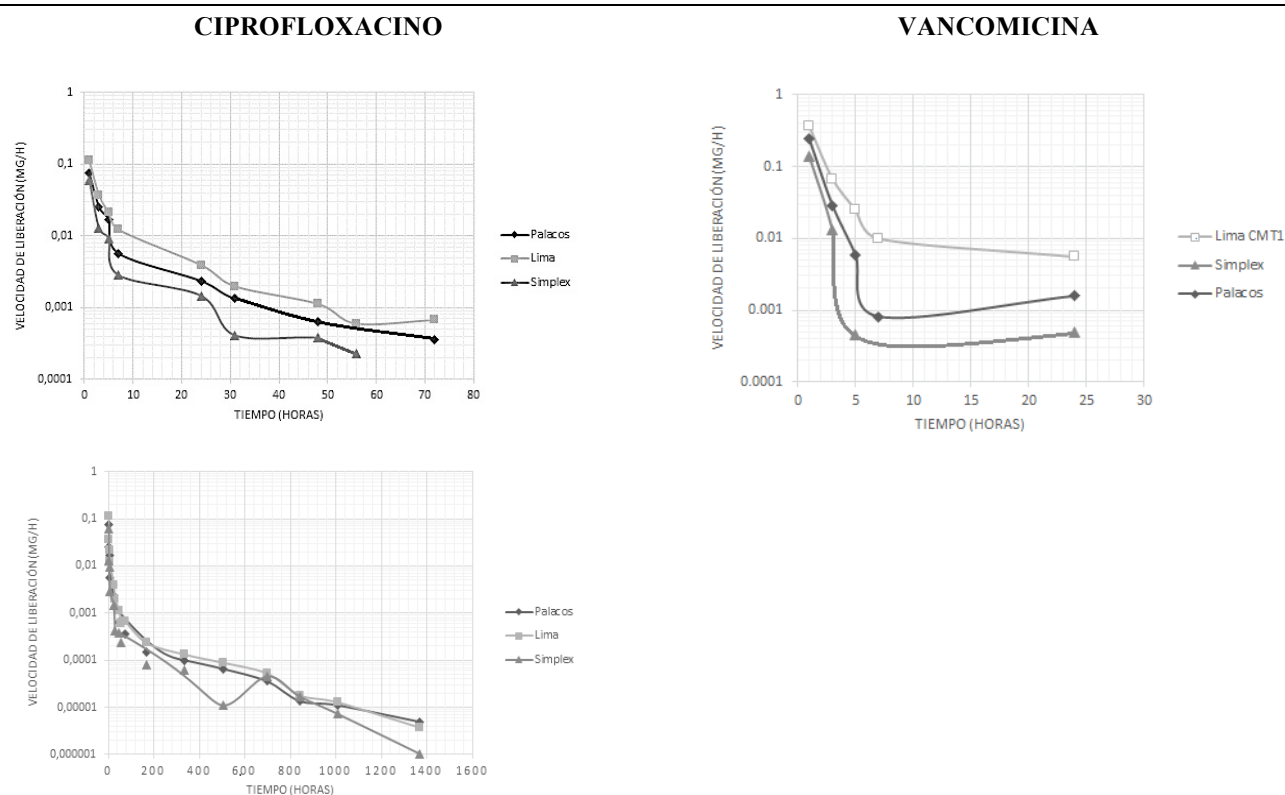


Figura 2. Velocidades de elución de ciprofloxacino clorhidrato y vancomicina desde los cementos poliacrílicos estudiados.

Mediante los ejercicios de simulación de Monte Carlo se ha obtenido una población simulada de 100 pacientes de una edad media de $69,17 \pm 14,28$ años y de un peso medio de $74,18 \pm 14,47$ kg. Las concentraciones simuladas de ciprofloxacino y vancomicina en el lugar del implante

(apartado de material y método) indican que transcurridas 24 horas de la intervención, en más del 90% de los pacientes serían superiores a 0,1 y 0,2 mcg/mL, de ciprofloxacino y vancomicina respectivamente (Figura 3).

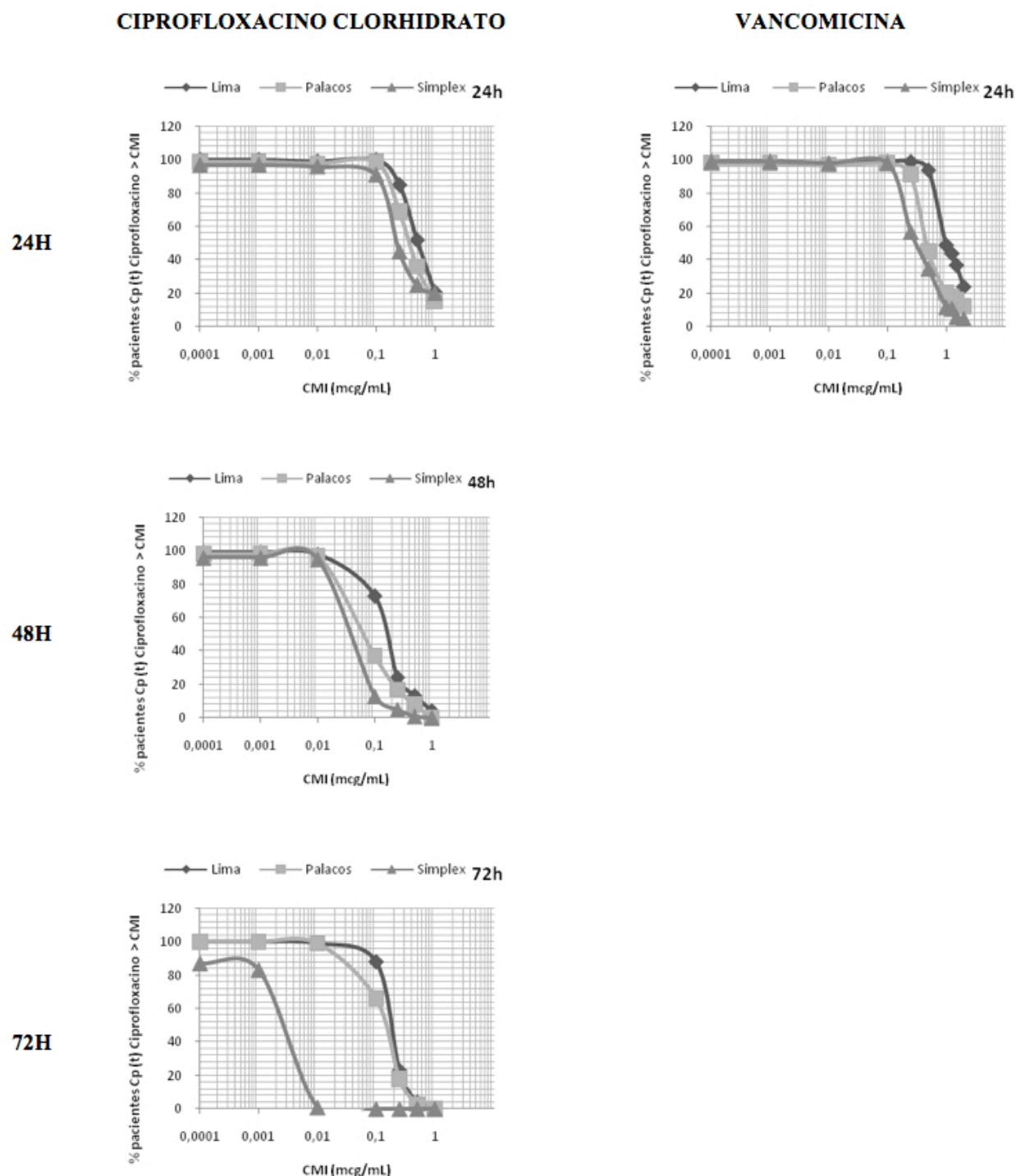


Figura 3. Evaluación de la bioactividad de las muestras estudiadas. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de pacientes cuya concentración de antibiótico en el lugar del implante, transcurridas 24, 48 y 72 h de la intervención para el ciprofloxacino y transcurridas 24 h de la intervención para la vancomicina, sería igual o superior a la concentración mínima inhibitoria (CMI) indicada en el eje de abscisas.

4. DISCUSIÓN

La inclusión de antibióticos directamente en cementos poliacrílicos usados para la fijación de prótesis óseas

representa un sistema de liberación modificada de fármacos. Estos sistemas facilitan el acceso del antibiótico a la biofase y por ello aportan principalmente dos ventajas: el mayor aprovechamiento del fármaco en el lugar de acción y una disminución de reacciones adversas. La liberación modificada de fármacos a partir de sistemas matriciales exhibe un patrón de comportamiento común compuesto por dos etapas; una, de liberación inicial rápida, que por lo general ocurre durante las primeras 24-48 horas, y otra de liberación lenta, en tiempos posteriores a las 48 horas, en la que el fármaco se libera a una velocidad más lenta. La liberación inicial está fundamentalmente determinada por la cantidad de fármaco que queda adsorbido en la superficie de la matriz y la difusión por los poros y canales que componen su estructura interna, los cuales se llenan con el medio de incubación durante las primeras horas de ensayo. En la fase posterior, de liberación lenta, en la que la velocidad de liberación y la cantidad de fármaco liberada es inferior, contribuyen los procesos de difusión a través de los poros y canales del sistema matricial, los cuales se forman como producto del proceso de fabricación o por la modificación de la estructura matricial, como consecuencia de la disolución de componentes hidrosolubles de su composición.

La fase inicial, de velocidad de liberación elevada, es de menor duración para la vancomicina y presenta una velocidad más elevada que la obtenida para el ciprofloxacino. Este fenómeno se puede atribuir a la mayor solubilidad acuosa de la vancomicina (100 mg/mL frente a 30 mg/L del ciprofloxacino). Este hecho indica que la disolución de las partículas de vancomicina situadas sobre la superficie se realiza con mayor velocidad facilitándose la liberación y posterior disolución de las partículas próximas a la superficie en un periodo de tiempo breve.

Las cantidades de ciprofloxacino liberadas a partir de las mezclas evaluadas en este estudio son superiores a las cantidades de antibiótico liberadas en un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación en el que se evaluó la liberación del ciprofloxacino a partir de mezclas simples, constituidas por el antibiótico y los diferentes cementos óseos (225% superior en las mezclas combinadas con el cemento LimaCMT1®, un 183% con el cemento Palacos® y un 126% con el cemento Simplex®)(23). Estas diferencias permiten corroborar que el hecho de incorporar más de un fármaco a los cementos óseos potencia en gran medida la velocidad de liberación de ambos. En este caso la vancomicina incorporada en la mezcla, favorece la formación de un mayor número de poros y canales que facilitan la entrada de agua en la matriz y la posterior disolución del ciprofloxacino desde su interior.

Las cantidades de antibiótico liberadas así como la evolución temporal de la velocidad de liberación es mayor para las mezclas elaboradas con el cemento LimaCMT1® (Figuras 2 y 3). Estos resultados son compatibles con la menor porosidad del cemento Simplex® indicada por Stryker®, laboratorio fabricante del producto (24).

Las cantidades de antibiótico liberadas desde los

cementos estudiados en combinación con los valores del aclaramiento local del fármaco, atribuido mayoritariamente al drenaje de la herida, y los valores del volumen de líquido en el espacio articular permitieron abordar el estudio de bioactividad simulada. Como se observa en la Figura 3, a las 24 horas post intervención quirúrgica las concentraciones de ciprofloxacino predichas en el lugar del implante son superiores a 0,1 mcg/mL con los tres cementos estudiados y las concentraciones de vancomicina superiores a 0,5, 0,3 y 0,1 mcg/mL en el caso de LimaCMT1®, Palacos® y Simplex®, respectivamente, en el total de la población simulada. Estos resultados indican que es de prever que la cobertura local con los antibióticos estudiados sea eficaz para patógenos sensibles a concentraciones inferiores a las indicadas. Transcurridas 48 h de la intervención, en el total de la población simulada, la concentración de ciprofloxacino en el lugar del implante se reduciría una décima parte; a las 72 h post-implante la concentración en el lugar del implante incrementaría y alcanzaría un valor equivalente al obtenido a las 24 h excepto en el caso del cemento Simplex®. En el caso de la vancomicina, a partir de las 24 horas posteriores a la intervención quirúrgica, la liberación del antibiótico desde los cementos Palacos® y Simplex® es nula, y a efectos prácticos también despreciable desde el cemento LimaCMT1®.

Las oscilaciones de concentración de ciprofloxacino durante los primeros días de la intervención quirúrgica, están relacionadas con la fluctuación y la variabilidad del drenaje de la herida quirúrgica producida durante las 72 horas posteriores a la intervención, ya que en este corto periodo de tiempo el drenaje local se reduce hasta alcanzar valores que representan entorno el 25% del valor inicial ($20,42 \pm 11,3$ mL/h; $9,33 \pm 11,02$ mL/h y $4,11 \pm 2,95$ mL/h respectivamente) (19). En general, el drenaje externo de la herida se retira a partir del tercer día de la intervención quirúrgica. A partir de este momento, la evolución temporal de la concentración de antibiótico en el lugar del implante estará condicionada por el proceso de distribución y retorno del fármaco a la circulación sistémica. Por ello, es de prever que a partir del tercer día post-intervención quirúrgica la concentración de fármaco en el lugar del implante de la prótesis alcance valores más elevados, aumentando si cabe la cobertura antibiótica obtenida durante los primeros días.

En resumen, el estudio realizado pone de manifiesto que la bioactividad de las muestras es dependiente del cemento acrílico, el día postquirúrgico, el microorganismo causante y su sensibilidad. Si se analiza la prevalencia de infecciones diagnosticadas en nuestro entorno se observa que *S. aureus* es el principal agente causante de las infecciones protésicas, ya que se ha aislado en un 30% del total de infecciones, mientras que otros microorganismos, entre ellos *S. Coagulasa Negativos* y *Pseudomonas aeruginos* y *E. Coli* se han aislado en un porcentaje inferior, 14% los dos primeros y 12% el último (22). Teniendo en cuenta esta situación y considerando que el ámbito de valores de la CMI de ciprofloxacino para *S.*

aureus *Meticilin resistente* está comprendido entre 0,5 y 2 mcg/mL únicamente se alcanzarían concentraciones efectivas en el lugar de acción para cepas sensibles al ciprofloxacino a concentraciones inferiores a 1 mcg/mL. La bioactividad de vancomicina durante las 24 horas posteriores a la intervención quirúrgica es superior a la de ciprofloxacino. Sin embargo, puede ser nula para tiempos posteriores ya que la cantidad de vancomicina retenida en el interior de la matriz no se libera al medio. Durante las primeras 72 horas posteriores a la intervención quirúrgica la velocidad de liberación del ciprofloxacino incorporado al cemento LimaCMT1® es superior, lo que indica que éste reúne una capacidad cinética ligeramente superior a los otros cementos ensayados. En tiempos posteriores la bioactividad del ciprofloxacino incorporado en los tres cementos estudiados es similar.

5. CONCLUSIONES

Los cementos poliacrílicos cargados con ciprofloxacino y vancomicina son sistemas de liberación modificada que asegurarían durante las primeras 72 h bioactividad frente algunos microorganismos, pero no garantizan una cobertura completa para todos los posibles agentes causantes. Ante una situación de mayor riesgo sería conveniente seleccionar el cemento LimaCMT1®, por las propiedades cinéticas ligeramente favorables en relación a los otros cementos estudiados, así como utilizar la combinación de antibióticos que facilite la velocidad de liberación del antibiótico desde la matriz. Por último, es deseable seguir investigando y profundizando en estos estudios con la finalidad de disponer de información que ayude a optimizar la incorporación de antibióticos a los cementos óseos para facilitar la selección de mezclas que aseguren una bioactividad elevada, fundamentalmente, durante los primeros tres días post implante de la prótesis articular.

6. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

7. REFERENCIAS

1. Anagnostakos K, Furst O and Kelm J. Antibiotic-impregnated PMMA hip spacers: Current status. *Acta Orthop*. 2006; 77: 628-37.
2. Buchholz HW and Engelbrecht H. [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chirurg*. 1970; 41: 511-5.
3. Wang J, Zhu C, Cheng T, et al. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PLoS One*. 2013; 8: e82745.
4. Penner MJ, Masri BA and Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthroplasty*. 1996; 11: 939-44.
5. Lawson KJ, Marks KE, Brems J and Rehm S. Vancomycin vs tobramycin elution from polymethylmethacrylate: an in vitro study. *Orthopedics*. 1990; 13: 521-4.
6. Penner MJ, Duncan CP and Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. *J Arthroplasty*. 1999; 14: 209-14.
7. DeLuise M and Scott CP. Addition of hand-blended generic tobramycin in bone cement: effect on mechanical strength. *Orthopedics*. 2004; 27: 1289-91.
8. Lewis G, Janna S and Bhattaram A. Influence of the method of blending an antibiotic powder with an acrylic bone cement powder on physical, mechanical, and thermal properties of the cured cement. *Biomaterials*. 2005; 26: 4317-25.
9. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC and Busscher HJ. The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. *Acta Orthop Scand*. 2003; 74: 670-6.
10. Anagnostakos K, Hitzler P, Pape D, Kohn D and Kelm J. Persistence of bacterial growth on antibiotic-loaded beads: is it actually a problem? *Acta Orthop*. 2008; 79: 302-7.
11. Thomes B, Murray P and Bouchier-Hayes D. Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *J Bone Joint Surg Br*. 2002; 84: 758-60.
12. Baleani M, Persson C, Zolezzi C, Andollina A, Borrelli AM and Tigani D. Biological and biomechanical effects of vancomycin and meropenem in acrylic bone cement. *J Arthroplasty*. 2008; 23: 1232-8.
13. Aslan TT, Oztemur Z, Cifci M, Tezeren G, Ozturk H and Bulut O. Biomechanical properties of ciprofloxacin loaded bone cement. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*. 2013; 47: 55-9.
14. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van Der Mei HC and Busscher HJ. *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. *Biomaterials*. 2001; 22: 1607-11.
15. Moojen DJ, Hentenaar B, Charles Vogely H, Verbout AJ, Castelein RM and Dhert WJ. In vitro release of antibiotics from commercial PMMA beads and articulating hip spacers. *J Arthroplasty*. 2008; 23: 1152-6.
16. Hendriks JG, van Horn JR, van der Mei HC and Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials*. 2004; 25: 545-56.
17. Rukhsana J, Perrotta PL, Okorodudu AO, Petersen JR and Mohammad AA. Fit-for-purpose evaluation of architect i1000SR immunoassay analyzer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010; 411: 798-801.
18. Dwyer MK, Jones HL, Hogan MG, Field RE, McCarthy JC and Noble PC. The acetabular labrum regulates fluid circulation of the hip joint during functional activities. *Am J Sports Med*. 2014; 42: 812-

- 9.
19. López-Anglada Fernández E, García Villabrille S, Fernández Bances I, et al. Utilización de aprotinina como agente hemostático en la prótesis total de cadera. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2006; 50: 307-17.
20. Paiva RM, Mombach Pinheiro Machado AB, Zavascki AP and Barth AL. Vancomycin MIC for methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates: evaluation of the broth microdilution and Etest methods. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48: 4652-4.
21. Abujheisha K. Determinación de la carga crítica como nuevo método alternativo al estándar de difusión en agar para establecer la sensibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos. Tesis Doctoral. Granada: Universidad de Granada, 2005, p. 177.
22. Camarena JJ, Rodrigo JL, González R, Chanza M and Nogueira JM. Infecciones nosocomiales de localización quirúrgica por gram negativos multirresistentes en COT con implantación de prótesis. Sevilla: XIII Reunión Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008.
23. Martínez-Moreno J, Mura C, Merino V, Nacher A, Climente M and Merino-Sanjuan M. Study of the Influence of Bone Cement Type and Mixing Method on the Bioactivity and the Elution Kinetics of Ciprofloxacin. *J Arthroplasty*. 2015; 30: 1243-9.
24. Linden U. Fatigue properties of bone cement: Comparison of Mixing Techniques. *Acta Orthop Scand* 1989; 60: 431-3.



Functional characterization of P2Y₁ and P2X₄ receptors in human neuroblastoma SK-N-MC cells

Title in Spanish: *Caracterización funcional de receptores P2Y₁ y P2X₄ en células SK-N-MC de neuroblastoma humano*

Javier Gualix^{1*}, Miriam León-Otegui¹, María Recuero², María Jesús Bullido², Fernando Valdivieso² and M. Teresa Miras-Portugal¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. ²Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M.). Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. IdiPAZ - Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

ABSTRACT: Nucleotides are important signalling molecules in both the peripheral and central nervous system. However, the *in vitro* study of their receptors can be hampered by the heterogeneity of primary neuronal cultures. The use of clonal neuroblastoma cell lines allows to circumvent this difficulty, so these lines are often used as a model to analyze the properties, regulation and physiological role of nucleotide receptors in neural tissues. Expression studies indicated the presence of P2Y₁, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₃, P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆ and P2X₇ proteins in SK-N-MC cells. Functional analyses showed transient [Ca²⁺]_i increases upon application of ADP, 2-MeSADP or ADPβS. Responses to these agonists seem to be mediated by a P2Y₁ receptor, as demonstrated by the almost complete blockade exerted by the P2Y₁-selective antagonist MRS2179. ATP was also able to induce [Ca²⁺]_i increases in SK-N-MC cells. Responses to ATP were partially blocked by MRS2179 and the P2X antagonist TNP-ATP, thus suggesting that ATP can interact with two different P2 receptors: a P2Y₁ receptor, inhibited by MRS2179, and a TNP-ATP sensitive P2X receptor. To characterize the P2X receptor responsible for the MRS2179-resistant component of the ATP response, we analyze the effect of several P2X agonists on [Ca²⁺]_i. Cells did not show responses to either α,β-meATP or BzATP, although [Ca²⁺]_i increases could be observed when cells were challenged with CTP. Both the response to CTP and the MRS2179-resistant component of ATP response were potentiated by ivermectin. Such pharmacological profile is consistent with the presence of a functional P2X₄ receptor in SK-N-MC cell line.

RESUMEN: Los nucleótidos son importantes moléculas señalizadoras en el sistema nervioso. El estudio *in vitro* de sus receptores puede verse obstaculizado por la heterogeneidad de los cultivos neuronales. El uso de líneas celulares de neuroblastoma permite eludir esta dificultad y dichas líneas se utilizan frecuentemente como un modelo con el que analizar las propiedades, regulación y función de los receptores de nucleótidos en tejidos neurales. Estudios de expresión indicaron la presencia de proteínas P2Y₁, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₃, P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆ y P2X₇ en las células SK-N-MC. Análisis funcionales mostraron incrementos transitorios de [Ca²⁺]_i tras la aplicación de ADP, 2-MeSADP o ADPβS, respuestas que parecen estar mediadas a través un receptor P2Y₁, como se pone de manifiesto por el bloqueo casi total ejercido por el antagonista selectivo P2Y₁, MRS2179. El ATP también indujo incrementos de [Ca²⁺]_i en las células SK-N-MC, siendo su respuesta parcialmente bloqueada por MRS2179 y por el antagonista P2X TNP-ATP, lo que sugiere que el ATP puede interactuar con dos receptores P2 diferentes: un receptor P2Y₁, inhibido por MRS2179, y un receptor P2X sensible a TNP-ATP. Se caracterizó el receptor P2X analizando el efecto de varios agonistas en la [Ca²⁺]_i. Ninguna célula mostró respuestas a α,β-meATP o BzATP, aunque se observaron incrementos de [Ca²⁺]_i cuando las células fueron estimuladas con CTP. Tanto la respuesta a CTP como el componente de la respuesta a ATP resistente a MRS2179, se potenciaron en presencia de ivermectina. Todos estos datos sugieren la presencia de un receptor P2X₄ funcional en las células SK-N-MC.

*Corresponding Author: jgualix@ucm.es

Received: June 22, 2015 Accepted: November 5, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 3 (2015), pp. 247-257

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Extracellular nucleotides have major roles in the activity of neural cells. They act as transmitters or modulators in most nerve types in the peripheral and central nervous system. Furthermore, they also act as important mediators in neuronal-glia or glia-glia communication and are trophic factors participating in cell

differentiation, proliferation, migration and death (1, 2). Nucleotide-mediated signaling mechanisms and specific receptor subtypes have been shown to be involved in various pathological conditions including brain trauma and ischaemia, neurodegenerative diseases involving neuroimmune and neuroinflammatory reactions, as well as in neuropsychiatric diseases (3).

Nucleotide effects are mediated through two subclasses of specific cell surface receptors, ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors (4). Seven distinct P2X subtypes (P2X₁₋₇) have been cloned from mammalian species, showing a topology that includes two transmembrane spanning regions, a large extracellular loop and intracellular N and C termini. These proteins assemble into ATP activated channels either as homomers or heteromers, each functional receptor containing at least three monomers. P2X receptor activation results in Na⁺ and Ca²⁺ influx across the cell membrane, which leads to depolarization. Membrane depolarization subsequently activates voltage-operated calcium channels, thus causing accumulation of Ca²⁺ ions in the cytoplasm. Although the detailed signalling mechanism has not been established for most P2X receptor subtypes, it is well known that cytoplasmic Ca²⁺ elevation triggers a variety of intracellular events, in part, through activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), protein kinase C (PKC) and calmodulin (5-7).

The P2Y receptors are classical 7-transmembrane domain metabotropic receptors coupled to G proteins. Currently, eight P2Y receptor subtypes (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) have been cloned. P2Y_{1, 11, 12, 13} receptors are selectively activated by adenine nucleotides, whereas P2Y₄ and P2Y₆ are stimulated by pyrimidines. The P2Y₂ receptor responds equally well to purine and pyrimidine triphosphates (ATP and UTP) and P2Y₁₄ is a sugar-nucleotide (UDP-glucose) responding receptor. Most members of the P2Y family (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11}) are functionally coupled to G_{q/11} proteins and stimulate phosphoinositide-specific phospholipase C, resulting in the formation of inositol-(1,4,5)-trisphosphate and diacylglycerol with subsequent mobilization of Ca²⁺ from internal stores. P2Y₁₁ receptor additionally stimulates adenylate cyclase, whereas P2Y₁₂, P2Y₁₃ and P2Y₁₄ promote G_{i/o} inhibition of adenylate cyclase activity. The stimulation of several P2Y receptors is also commonly associated with the activation of MAPKs (in particular extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, ERK1/2). Other classes of protein, such as phospholipases A₂ and D, PKC or phosphatidylinositol 3-kinase, can be also activated according to the cell context and the particular P2Y subtype (5, 8, 9).

Several neuroblastoma cell lines, each originating from a single cell that has been isolated from a spontaneously occurring or induced tumor of the nervous system, are now available and can be maintained in culture infinitely. Neuroblastoma derived cell lines have been used as an *in vitro* model for the study of a variety of neurotransmitter receptors including those for nucleotides. Indeed, the P2Y₂ receptor was originally cloned from the mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid line NG108-15 (10). Further studies have revealed the presence in these cells of the P2X₇ receptor and metabotropic receptors other than the P2Y₂ subtype (11, 12). Functional P2X₇ receptors can be also detected in different human neuroblastoma lines (13, 14) as well as in the mouse Neuro-2a neuroblastoma cells (6, 15). In addition, a range of cell lines of both

mouse and human neuroblastoma origin have been shown to functionally express pyrimidine selective P2Y receptors (16-18).

SK-N-MC human neuroblastoma are known to constitutively express adrenergic α_{2C} , β_1 and β_3 (19, 20), dopamine D₁ (21), neuropeptide Y₁ (22) and muscarinic M₁ receptors (23). The regulation and signalling pathways activated by these receptors have been extensively investigated using SK-N-MC cells as a model (24-28). SK-N-MC cell line also served to analyze the integration or cross-communication of signals upon activation of different types of neurotransmitter receptors (29). More recently, SK-N-MC has been used as a parental line with which generate cellular lines that stably overexpress proteins of interest in the study of distinct neurodegenerative disorders, such as the amyloid precursor protein APP (30), carboxyl-terminal fragments of the APP protein (31, 32), or different mutated forms of the Parkin protein (33).

Earlier experiments showed that ATP and other nucleotides are able to induce response (phosphoinositide hydrolysis and formation of inositol phosphates) in the SK-N-MC cells, thus indicating the presence of not fully characterized P2 receptors in this neuroblastoma cell line (23).

In the present study we have analyzed the presence of functional P2 receptors in the human neuroblastoma SK-N-MC cells. If such receptors were present in these cells, SK-N-MC cell line could serve as a useful model to analyze several aspects of the signalling mediated through nucleotide receptors in neural tissues. This includes the regulation and transduction pathways activated by P2 receptors, their interaction with other neurotransmitter receptors or their putative relationship with proteins involved in neurodegenerative processes

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

2-methylthio-adenosine-5'-diphosphate (2-MeSADP), α,β -methylene-adenosine 5'-triphosphate (α,β -meATP), ADP, adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) (ADP β S), ATP, 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP), CTP, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS), 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP), UDP, UTP and ivermectin were purchased from Sigma (St Louis, Missouri, USA). N⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate (MRS2179) was purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK). Products for cell culture, immunocytochemical and western-blot studies and fluorescent probes are included in the specific methods section. Other analytical grade reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Cell culture

The SK-N-MC human neuroblastoma cell line (HTB-10) was purchased from the American Type Culture

Collection (ATCC, Barcelona, Spain). Cells were grown in monolayer in 10-cm plastic culture dishes (BD Falcon, Erembodegem, Belgium) at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Culture medium was minimum essential medium (Gibco, Rockville, MD, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids (alanine, glutamic acid, aspartic acid, proline and asparagine, each at 0.4 mM), 100 units/mL penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Sigma).

Cells were subcultured about 2 times a week: culture medium was removed and discarded and the cell layer was rinsed two times with 2 mL of a solution containing 0.25% (w/v) trypsin and 0.02% (w/v) EDTA in Hank's Balanced Salt Solution with phenol red (Sigma). Then, culture dishes were placed in an incubator for 1 min at 37° to allow cells to detach. After that, 5 mL of the culture medium were added to the dishes and cells were aspirated by gently pipetting. Cells were counted in a Neubauer chamber using the trypan blue exclusion test and appropriate aliquots of the cell suspension were taken for the immunocytochemical, western blot or calcium imaging assays. Finally, 1 mL of the cell suspension was added to a new culture dish containing 9 mL of the culture medium and cells were maintained at 37°C in 5% CO₂.

2.3. Immunocytochemical assays

Cells were plated at a density of 200,000 cells/mL on glass coverslips precoated with 0.1 mg/mL poly-L-lysine (Biochrom AG, Berlin Germany) and maintained in a humidified incubator at 37 °C in 5% CO₂ for 2-3 days before they were used in the immunocytochemical experiments. Cover slips with the SK-N-MC cells attached were then treated with 4% (w/v) *p*-formaldehyde (Sigma) for 15 min, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) (composition mM: NaCl 137, KCl 2.6, KH₂PO₄ 1.5, Na₂HPO₄ 8.1, pH 7.4) and incubated for 1 h in PBS containing 3% (w/v) bovine serum albumine (BSA), 0.1% (v/v) Triton X-100 and 5% (v/v) normal goat or donkey serum (Sigma). Cells were washed three times with PBS/BSA and incubated with the primary antibody for 1 h at 37° C. Primary antibodies assayed were: rabbit anti-P2Y₁ (serum at 1:100 dilution) (Alomone labs, Jerusalem, Israel), rabbit anti-P2Y₂ (1:200) (Chemicon International, Temecula, CA, USA), rabbit anti-P2Y₄ (1:100) (Chemicon International), rabbit anti-P2Y₆ (1:100) (Alomone labs), rabbit anti-P2Y₁₁ (1:100) (Alomone labs), rabbit anti-P2Y₁₂ (1:100) (Alomone labs), rabbit anti P2Y₁₃ (1:50) (Alomone labs), rabbit anti-P2X₁ (1:100) (Chemicon International), guinea-pig anti-P2X₂ (1:250) (Chemicon International), guinea-pig anti-P2X₃ (1:500) (Chemicon International), rabbit anti-P2X₄ (1:100) (Alomone labs), rabbit anti-P2X₅ (1:200) (Alomone labs), rabbit anti-P2X₆ (1:100) (Alomone labs) or rabbit anti-P2X₇ (intracellular epitope, 1:100 dilution) (Alomone labs). All the antibodies used in this work were polyclonal and most of them were raised against the corresponding human protein. In some

cases, antibodies against the rat protein were also used (if it was the case, cross reactivity with the human protein has been verified by the manufacturer). Next, covers were washed three times with PBS/BSA and incubated for 1 h at 37°C with the secondary antibodies: donkey anti-rabbit IgG coupled to Cy3 (1:400) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) or fluorescein conjugated goat anti guinea-pig IgG (1:64) (Sigma). Then, covers were washed three times with PBS and mounted following standard procedures. Control experiments of nonspecific staining were performed without primary antibody or by preadsorption of the primary antibody with the immunizing peptide.

Fluorescent images were taken using a NIKON TE-200 microscope equipped with a S Fluor 40X objective (oil, 1.3 NA) a mercury lamp light source, fluorescein and rhodamine Nikon filter sets and a CCD camera (Kappa ACC 1) controlled by Kappa ImageBase software (Kappa opto-electronics, Gleichen, Germany).

2.4. Western blot

Cells were seeded on 10-cm plastic Petri dishes (BD Falcon) at a density of 400,000 cells/mL and maintained at 37 °C in 5% CO₂ for 2-3 days before any treatment. Western blot analysis were performed using protein extracted from the SK-N-MC cells by homogenization in a buffer containing 100 mM HEPES (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 50 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 µg/ml leupeptine, 0.5 µg/ml pepstatine, 0.2 M NaCl and 1% (v/v) Triton X-100. The samples were homogenized at 4°C and protein content determined by Bradford assay. Total protein (40 µg) was electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Whatman, Maidstone, UK). The membranes were blocked with 5% nonfat dried milk for 1 h at room temperature and further incubated overnight at 4°C with the different P2 receptor antibodies at a dilution of 1:500. Blots were then washed and incubated for 1 h at room temperature with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Protein bands were detected with enhanced chemoluminescence detection (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Incubation with the control peptide was made following the manufacturer instructions.

2.5. Calcium imaging

Cells were plated at a density of 200,000 cells/mL on glass coverslips precoated with 0.1 mg/mL poly-L-lysine (Biochrom) and maintained in a humidified incubator at 37 °C in 5% CO₂ for 2-3 days before they were used in the calcium imaging experiments. Cells attached to coverslips were then washed with Locke's solution (composition in mM: NaCl, 140; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 2.5; glucose, 5.5; HEPES, 10; pH 7.4) supplemented with 1 mg/mL BSA and loaded with 5 µM Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 30 min at 37 °C. Next, the coverslips were washed with Locke's medium and mounted in a small superfusion

chamber on the stage of a Nikon TE-200 microscope. Cells were superfused with Locke's solution, and different agonists of the P2 receptors were applied in 30s pulses. When the experiments were performed using P2 receptor antagonists (MRS2179, TNP-ATP) or potentiators (ivermectin), these compounds were superfused for 2 min before the application of the corresponding agonist.

Cells were alternately excited at 340 and 380 nm, these wavelengths corresponding to the fluorescence peaks of Ca^{2+} -saturated and Ca^{2+} -free Fura-2 solutions. The wavelength of the incoming light was selected with the aid of a Lambda 10-2 optical filter changer (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) and emitted light was isolated with a dichroic mirror (430 nm) and a 510 nm bandpass filter (Omega Optical). Cells were imaged through a NIKON 40X lens (S Fluor 1.3 oil iris) and 12-bit images were acquired using an ORCA-ER C 47 42-80 camera from Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan) controlled by MetaFluor 6.2r6 PC software (Universal Imaging Corp., Cambridge, UK). Time course data represent the average light intensity in a small elliptical region inside each cell. Background and autofluorescence components were subtracted at each wavelength and the 340/380 ratio was calculated. The data are represented as the normalized F340/F380 fluorescence ratio, which increases as $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases.

3. RESULTS

3.1. Immunological characterization of P2X subunits in SK-N-MC cells

In order to investigate the presence of native purinergic receptors in the SK-N-MC cells, the expression of P2X subunits was analyzed by using commercially available subunit-specific antibodies.

Western blot experiments demonstrate that most of the P2X subunits are expressed in SK-N-MC cells, as bands corresponding to monomeric P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆ and P2X₇ proteins can be immunodetected (results not shown).

As expected, immunocytochemical detection of P2X subunits correlated well with the results obtained by western blot. All P2X subunit antibodies, except that for the P2X₂ and P2X₃ subtypes, labeled the SK-N-MC cells. Immunostaining was specific as it disappeared when antibodies were pre-adsorbed with the corresponding antigen peptide (Figure 1).

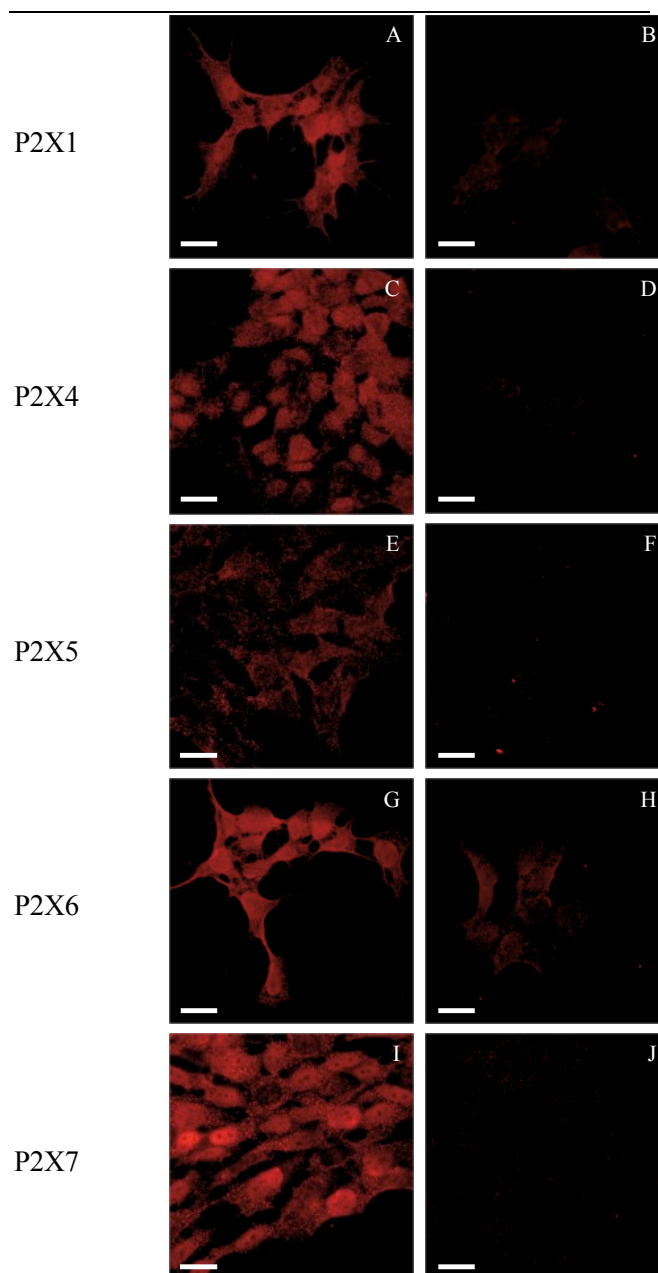


Figure 1. Immunological detection of P2X receptor subunits in SK-N-MC cells. Fluorescence image of SK-N-MC cells labeled with anti-P2X₁ (A), anti-P2X₄ (C), anti-P2X₅ (E), anti-P2X₆ (G) and anti-P2X₇ (I) antibodies. To confirm a specific immunoreaction, primary antibodies used in A, C, E, G and I were pre-absorbed with the corresponding control peptide and immunostaining are shown in B, D, F, H and J, respectively. Scale bar = 20 μm in all micrographs.

3.2. Immunological characterization of P2Y receptors in SK-N-MC cells

Immunological characterization of P2Y receptors was carried out using commercially available antibodies for the P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ and P2Y₁₃ subtypes.

Several P2Y receptors are simultaneously expressed in SK-N-MC cells, as specific bands corresponding to P2Y₁,

P2Y₆, P2Y₁₁ and P2Y₁₃ proteins can be detected in the western blot assays (results not shown). Again, immunocytochemical experiments correlated with the results obtained in the western blot experiments: SK-N-MC cells showed specific immunostaining with antibodies against P2Y₁, P2Y₆, P2Y₁₁ and P2Y₁₃ receptor subtypes (Figure 2). No immunostaining were observed with the antibodies for the P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₁₂ subtypes (results not shown).

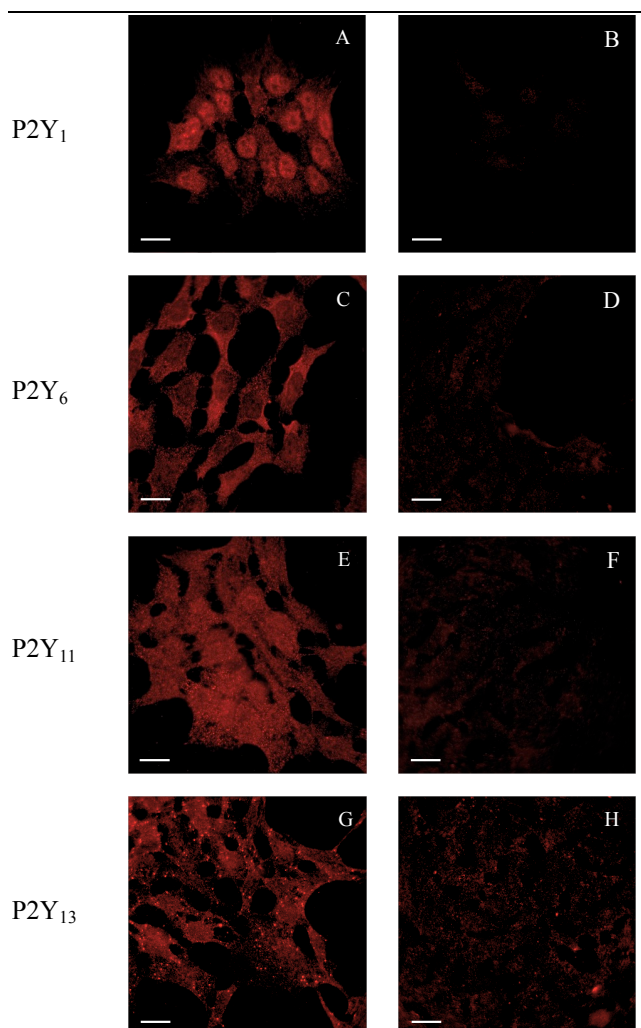


Figure 2. P2Y receptors immunodetection in SK-N-MC cells. Fluorescence image of SK-N-MC cells labeled with anti-P2Y₆ (C), anti-P2Y₁₁ (E) and anti-P2Y₁₃ (G) antibodies. To confirm a specific immunoreaction, the primary antibodies used in A, C, E and G were pre-absorbed with their corresponding control peptide and immunostaining are shown in B, D, F and H, respectively. Scale bar= 20 μ m in all micrographs.

3.3. Characterization of functional P2 receptors by calcium imaging in SK-N-MC cells

The immunodetection of different P2X subunits or P2Y receptors indicates the presence of the protein but does not give information concerning their functionality. To approach this specific issue, microfluorimetric techniques were used.

We analyzed the response of SK-N-MC cells to the

most commonly utilized P2 agonists by single-cell imaging after loading cells with the fluorescent calcium dye Fura-2 AM. A significant percentage of the cells ($91.5 \pm 1.5\%$ of total cells, $n = 240$) showed transient $[Ca^{2+}]_i$ increases upon application of 10 μ M ADP. Response to ADP is likely mediated by a P2Y₁ receptor, as demonstrated by the almost complete blockade exerted by the P2Y₁-selective antagonist MRS2179 (10 μ M, Fig. 3A). Other P2Y₁ agonists such as 2-MeSADP (10 μ M) or ADP β S (10 μ M) were also able to elicit $[Ca^{2+}]_i$ increases in the SK-N-MC cells, these responses being almost completely blocked by 10 μ M MRS2179 (Fig. 3B,C). Neither UDP (100 μ M) nor UTP (100 μ M) elicited calcium responses in the SK-N-MC cells (results not shown), thus precluding the presence of functional pyrimidine receptors.

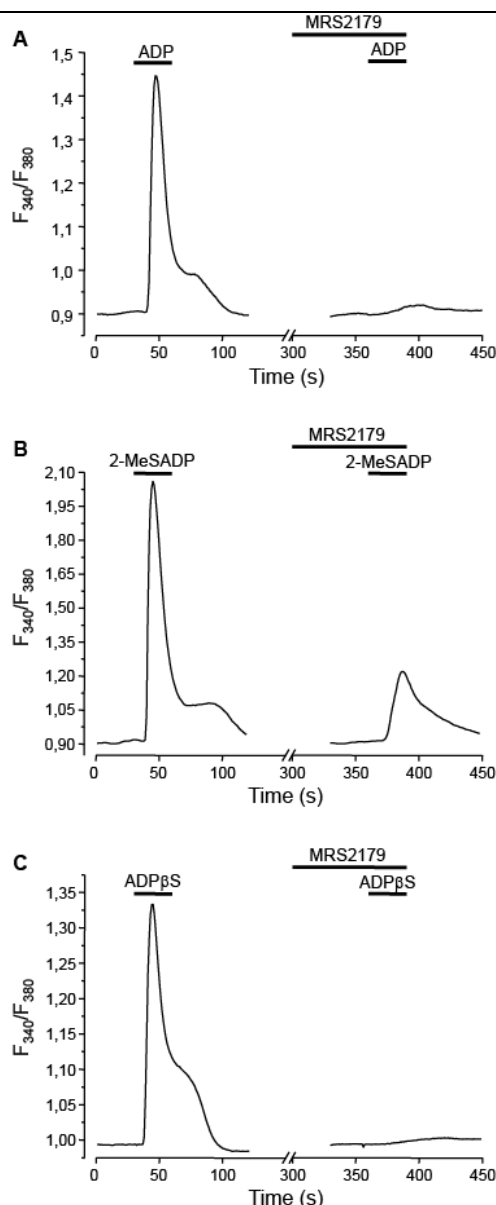


Figure 3. Stimulation of the SK-N-MC cells with ADP, 2-MeSADP or ADP β S induces intracellular transients that are inhibited by the P2Y₁ antagonist MRS2179. Changes in the

intracellular Ca^{2+} concentration were measured when cells were challenged with 10 μM ADP (**A**), 10 μM 2-MeSADP (**B**) OR 10 μM Ad βS (**C**), both in the absence and in the presence of the selective P2Y_1 antagonist, MRS 2179 (10 μM). Traces represent the mean of the responses measured in 156 (**A**), 140 (**B**) or 144 (**C**) individual cells. Horizontal bars above traces indicate duration of drug applications.

We also tested the ability of ATP (100 μM) to induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases in the SK-N-MC cells. Almost all SK-N-MC cells ($96.8 \pm 0.4\%$ of total cells, $n = 882$) showed responses when challenged with this nucleotide. Thus, ATP was used in some of our assays as an indicator of cell functionality (see Figures 5A and B). Responses to 100 μM ATP were partially blocked by MRS2179 (10 μM), the residual response observed in the presence of the antagonist being a 13.3 % of the original one (Fig 4A). The P2X antagonist TNP-ATP (100 μM) also acted as a partial inhibitor of ATP responses, reducing by 50.2 % the amplitude of the calcium transients elicited by the agonist (Fig 4B). When SK-N-MC cells were treated with both antagonists, MRS2179 (10 μM) and TNP-ATP (100 μM), responses to 100 μM ATP were completely blocked (results not shown). This is indicating that ATP is exerting its effects through the interaction with two different P2 receptors: a P2Y_1 receptor, sensitive to MRS2179, and a P2X receptor which is blocked by TNP-ATP.

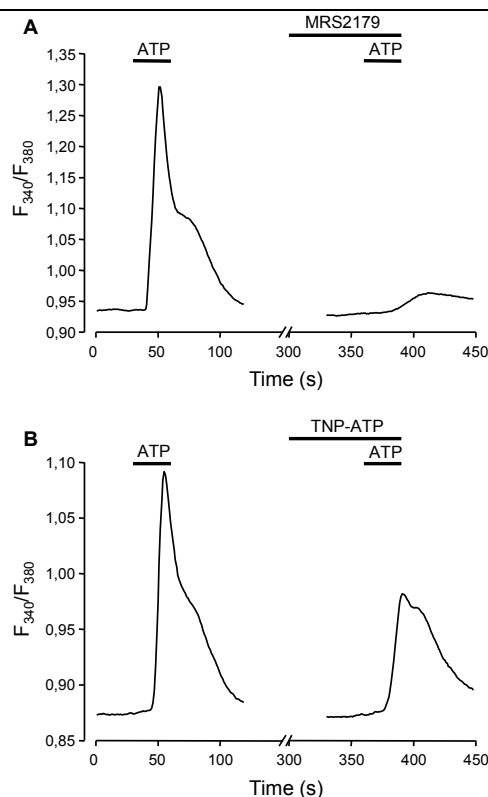


Figure 4. ATP induces calcium responses in the SK-N-MC cells that are inhibited by MRS2179 and TNP-ATP. Changes in the intracellular Ca^{2+} concentration were measured when cells were stimulated with 100 μM ATP applied alone or in the presence of the selective P2Y_1 antagonist, MRS 2179 (10 μM ,

A), or the P2X antagonist, TNP-ATP (100 μM , **B**). Traces represent the mean of the responses obtained in 128 (**A**) or 94 (**B**) individual cells. Horizontal bars above traces indicate duration of drug applications.

To further characterize the P2X receptor that is responsible for the MRS2179 resistant component of the ATP response, we analyze the effect of several P2X agonists on the SK-N-MC cells. No cells showed responses to either 100 μM α,β -meATP or 100 μM BzATP (Fig 5A). However, responses to CTP (300 μM) were present in a $67.6 \pm 10.1\%$ of the analysed cells ($n = 396$, Fig 5B). Moreover, both the response to CTP (300 μM) and the MRS2179-resistant component of the ATP (100 μM) response were potentiated in the presence of 5 μM ivermectin (Fig 5B and C), a positive allosteric modulator of the P2X4 receptor (34, 35).

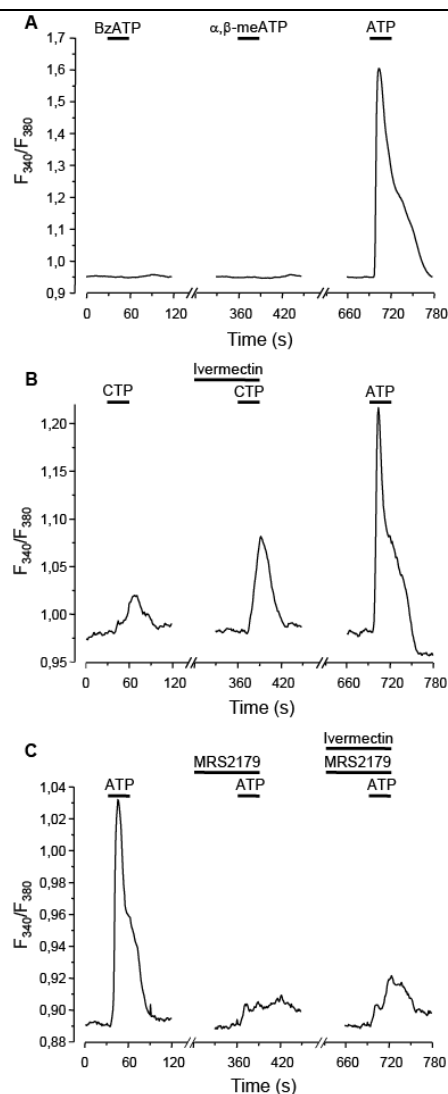


Figure 5. Intracellular calcium increments evoked by different purinergic agonists and effect of the P2X4 potentiator ivermectin in the SK-N-MC cells. (**A**) Effect of 100 μM BzATP or 100 μM α,β -meATP on the intracellular Ca^{2+} concentration in the SK-N-MC cells. At the end of the experiments, cells were challenged with 100 μM ATP to test their

functionality. Traces represent the mean of the responses obtained in 108 individual cells. **(B)** SK-N-MC cells were stimulated with 300 μ M CTP both in the absence and in the presence of the P2X₄ positive modulator ivermectin (5 μ M). At the end of the experiments, cells were challenged with 100 μ M ATP to test their functionality. Traces represent the mean of the responses obtained in 135 individual cells that showed responses to CTP. **(C)** SK-N-MC cells were stimulated with 100 μ M ATP, both in the absence and in the presence of the P2Y₁ antagonist MRS2179 (10 μ M), to selectively analyze the MRS2179-resistant component of the ATP response. Afterwards, cells were challenged with 100 μ M ATP in the presence of MRS2179 (10 μ M) and ivermectin (5 μ M), in order to analyze the effect of the positive modulator of the P2X₄ receptor on the MRS2179-resistant component of the ATP response. Traces are the mean of the responses measured in 140 individual cells. Horizontal bars above traces indicate duration of drug applications in all cases.

4. DISCUSSION

The limited biological material and the cellular heterogeneity of primary neuronal cultures frequently represent a disadvantage for the *in vitro* study of the nucleotide mediated signalling in the nervous system. The use of homogeneous cultured neuroblastoma cell lines that constitutively express P2 receptors allows avoiding these inconveniences, so these lines could constitute a reliable and convenient model with which analyze the signal transduction pathways and intracellular events associated with the activation of nucleotide receptors in neural tissues.

In the present study we have investigated the presence of functional P2 receptors in human neuroblastoma SK-N-MC cells by a combination of immunological and calcium measurement experiments. Immunological assays showed the expression of P2Y₁, P2Y₆, P2Y₁₁ and P2Y₁₃ receptors in the SK-N-MC cell line. P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆ and P2X₇ subunits can also be detected in the SK-N-MC cells by means of immunocytochemical and western blot assays.

Despite the abundant expression of P2 receptors in the SK-N-MC cells only a few range of P2X or P2Y agonists are able to elicit calcium responses. A similar feature can be also observed in other neuroblastoma cell types. For instance, murine N2a cells express a wide range of P2X subunits, including P2X₁, P2X₃, P2X₄ and P2X₇. However, of these, the P2X₇ receptor was the only functional receptor (6).

The finding that ADP, 2-MeSADP and ADP β S induce calcium increases that are inhibited by the subtype-selective P2Y₁-antagonist MRS2179 (36, 37), strongly support the presence of a functional P2Y₁ receptor in the SK-N-MC cell line. ADP and its derivatives also activate the P2Y₁₃ receptor (36, 38, 39), which can be immunologically detected in SK-N-MC cells. However if the calcium transient induced by these compounds were, at least in part, due to their interaction with a P2Y₁₃ receptor, a residual response should be observed in the presence of MRS2179 that, at concentrations up to 100 μ M, had no significant effect on the P2Y₁₃ receptor (36, 38). This is not the case: responses to ADP and ADP derivatives are almost completely blocked by MRS2179, thus indicating

that these agonists increase the intracellular calcium concentration due to their exclusive interaction with a P2Y₁ receptor in the SK-N-MC cells. On the other hand, the lack of effect of UDP, a selective agonist at the pyrimidinergic P2Y₆ receptor (36, 37), precludes the presence of functional P2Y₆ receptors in the SK-N-MC cells, in spite of our data showing their robust expression.

Regarding ATP, this nucleotide was also able to induce calcium transients in the SK-N-MC cells. The partial inhibition that both the specific P2Y₁ antagonists MRS2179 and the P2X antagonist TNP-ATP (40) exert on the ATP responses indicates that this nucleotide is activating at least two different receptors in the SK-N-MC cells: the previously mentioned P2Y₁ receptor, which is blocked by MRS2179, and a P2X receptor, inhibited by TNP-ATP. P2Y₁₁ receptor, which is sensitive to ATP (36, 37), can be also detected at the protein level in the SK-N-MC cells. However, if ATP were activating also this receptor, a residual response to the agonist should be observed in the combined presence of MRS2179 and TNP-ATP. This is not the case: ATP responses in SK-N-MC cells are completely blocked by means of a combination of MRS2179 and TNP-ATP. Additionally, the lack of effect of BzATP and UTP, both potent agonists at the P2Y₁₁ receptor (36, 41), also precludes the presence of functional P2Y₁₁ receptors in the SK-N-MC cell line.

We tried to establish the identity of the P2X receptor that is responsible for the MRS2179-resistant component of the ATP response. SK-N-MC cells did not respond to α,β -meATP or BzATP but increased their $[Ca^{2+}]_i$ when challenged with CTP. Although P2X₁ and P2X₆ subunits can be immunodetected in the SK-N-MC cells, the presence of functional P2X₁ or P2X₆ channels can be ruled out due the lack of action of α,β -meATP, a potent agonist of both receptors (42-44). α,β -meATP is a weak or inactive agonist at the P2X₅ and P2X₇ receptors but, if these channels were functional in the SK-N-MC cells, responses to BzATP should be obtained, as both receptors are activated by this nucleotide analog (42, 45, 46). The pattern of agonist activity observed in the SK-N-MC cells is, however, consistent with the presence of a functional P2X₄ receptor. P2X₄ channels have been proved to be nearly insensitive to methylene-substituted ATP analogs, whereas they can be activated by CTP, this compound being a less potent agonist than ATP (42, 47). An unusual property of the P2X₄ receptor that differentiates it from all other homomeric P2X channels is its potentiation by ivermectin. This antiparasitic agent is a positive allosteric modulator that specifically augments the response of P2X₄ receptor to its agonists (34, 35). SK-N-MC cells showed responses to CTP that increased in the presence of ivermectin, this being an additional evidence favouring the presence of a functional P2X₄ receptor in the SK-N-MC cell line. Moreover, the residual responses to ATP in the presence of MRS2179 were also potentiated by ivermectin, which could indicate that the P2X₄ receptor is responsible for the MRS2179-resistant component of the ATP response in the SK-N-MC cells.

As SK-N-MC cells express different P2X subunits, the possible formation of heteromeric assemblies, in which P2X4 subunits were present, should be taken into consideration. Three different P2X4-containing heteromeric channels have been described so far: P2X1/4, P2X4/6 and P2X4/7 receptors (48-50). P2X4/7 heteromeric receptor shares some of the pharmacological properties of the P2X receptor in the SK-N-MC cells, as it is potentiated by ivermectin (48). However there is a clear difference between both receptors: heteromeric P2X4/7 receptor is activated by BzATP (48) whereas the P2X receptor in SK-N-MC cells has been proved to be insensitive to this nucleotide analog. Regarding P2X1/4 and P2X4/6 receptors, the phenotype of such heteromers differs in some aspects from that of P2X4. For example, heteromeric P2X1/4 and P2X4/6 receptors are activated by low concentrations of α,β -meATP, whereas homomeric P2X4 receptors are relatively insensitive to this substance (49, 50). As P2X receptors in SK-N-MC cells appear to be unaffected by α,β -me-ATP, it seems more probable that they were formed by a homomeric combination of P2X4 subunits rather than a heteromeric combination of P2X4 with the P2X1 or the P2X6 subunits. However, as SK-N-MC cells also express some additional P2X subunit, such as P2X5, a heteromeric association between this subunit and the P2X4 one can not be ruled out.

Taken together, these pharmacological data likely indicate the presence of two functional P2 receptors in the human neuroblastoma SK-M-MC cell line: one metabotropic, P2Y₁, and the other ionotropic, P2X4 (or a heteromeric channel including the P2X4 subunit). Responses to ADP and its derivatives will be mediated through the activation of the P2Y₁ receptor, although responses to ATP will be due to the interaction of such nucleotide with both the P2Y₁ and the P2X4 receptors. CTP, on their hand, will only activate the ionotropic P2X4 receptor.

P2X4 receptor, which is expressed in several regions of the brain and spinal cord (51, 52), has received considerable recent attention due to its emerging role in the modulation of chronic inflammatory and neurophatic pain (53-55). There are also evidences suggesting that P2X4 receptors could be involved in the mechanism sustaining neuronal cell death caused by oxygen/glucose deprivation (56, 57). More recently, a role of the P2X4 receptor in the long term potentiation in the hippocampus has been described (58).

Regarding P2Y₁, immunohistochemical studies showed an abundant and widespread distribution of this receptor throughout the human brain, suggesting its involvement in a number of important functions (59). In post-mortem brain sections from persons with Alzheimer's disease, the P2Y₁-like immunoreactivity in the hippocampus and entorhinal cortex was localized to neurofibrillary tangles, neuritic plaques and neuropil threads, which are characteristic Alzheimer's structures (60). On the other hand, it is now recognized that interactions between G protein-coupled receptors can take place through the

formation of oligomers, a process commonly referred to as receptor dimerization. There is evidence that P2Y₁ receptors can form both homodimers and heteromeric complexes with the P2Y₁₁ or A1 receptors (61, 62). Such kinds of interaction will contribute to add complexity to the purinergic signalling

5. CONCLUSIONS

In summary, P2Y₁ and P2X4 receptors are widespread in the CNS where they can participate in a number of different and important functions. As these receptors are constitutively expressed and functional in SK-N-MC cells, such cells can constitute a useful model with which analyze several aspects of the physiology of both nucleotide receptors. These include their regulation, associated intracellular signalling pathways, oligomerization, cross-talk with other neurotransmitter systems and putative implication in neurological or neurodegenerative disorders.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2014-53654-P) and Comunidad de Madrid (S2013/ICE-2958 BRADE-CM).

7. ABBREVIATIONS LIST

2-MeSADP, 2-methylthio-adenosine-5'-diphosphate; α,β -meATP, α,β -methylene-adenosine 5'-triphosphate; ADP β S, adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate); APP, amyloid precursor protein; BSA, bovine serum albumin; BzATP, 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate; ERK1/2, extracellular signal-regulated protein kinase 1/2; Fura-2 AM, fura-2 acetoxymethyl ester; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; MRS2179, N⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate; PBS, phosphate-buffered saline; PKC, protein kinase C; PPADS, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid; TNP-ATP, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate.

8. REFERENCES

1. Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 2006; 109: 297-324.
2. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87: 659-797.
3. Burnstock G, Krügel U, Abbracchio MP, Illes P. Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol* 2011; 95: 229-74.
4. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 1471-83.
5. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 2006; 452: 552-62.
6. Gomez-Villafuertes R, del Puerto A, Diaz-Hernandez

- M, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X₇ receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J* 2009; 276: 5307-25.
7. Ortega F, Pérez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT. P2X₇, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 1723-33.
8. Morente V, Pérez-Sen R, Ortega F, Huerta-Cepas J, Delicado EG, Miras-Portugal MT. Neuroprotection elicited by P2Y₁₃ receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 1886-98.
9. Ortega F, Pérez-Sen R, Miras-Portugal MT. Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and β -catenin nuclear translocation in granule neurons. *J Neurochem* 2008; 104: 62-73.
10. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5113-17.
11. Kaiho H, Matsuoka I, Kimura J, Nakanishi H. Identification of P2X₇ (P2Z) receptor in N18TG-2 cells and NG108-15 cells. *J Neurochem* 1998; 70: 951-57.
12. Sak K, Samuel K, Kelve M, Webb TE. Pharmacological characterisation of pyrimidinoceptor responses in NG108-15 cells. *Eur J Pharmacol* 2001; 415: 127-33.
13. Larsson KP, Hansen AJ, Dissing S. The human SH-SY5Y neuroblastoma cell-line expresses a functional P2X₇ purinoceptor that modulates voltage-dependent Ca²⁺ channel function. *J Neurochem* 2002; 83: 285-98.
14. Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. The P2X₇ receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* 2006; 66: 907-14.
15. Wu PY, Lin YC, Chang CL, *et al.* Functional decreases in P2X₇ receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cell Signal* 2009; 21: 881-91.
16. Cavaliere F, Nestola V, Amadio S, *et al.* The metabotropic P2Y₄ receptor participates in the commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 100-9.
17. Sak K, Webb TE, Samuel K, Kelve M, Jarv J. Only pyrimidinoceptors are functionally expressed in mouse neuroblastoma cell lines. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; 1: 203-8.
18. Lee H, Choi BH, Suh BC, Lee SK, Kim KT. Attenuation of signal flow from P2Y₆ receptor by protein kinase C- α in SK-N-BE(2)C human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2003; 85: 1043-53.
19. Esbenshade TA, Han C, Theroux TL, Granneman JG, Minneman KP. Coexisting beta 1- and atypical beta-adrenergic receptors cause redundant increases in cyclic AMP in human neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 753-9.
20. Schaak S, Cayla C, Blaise R, Quinchon F, Paris H. HepG2 and SK-N-MC: two human models to study alpha-2 adrenergic receptors of the alpha-2C subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 983-91.
21. Sidhu A., Fishman PH. Identification and characterization of functional D1 dopamine receptors in a human neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166: 574-9.
22. Gordon EA, Kohout TA, Fishman PH. Characterization of functional neuropeptide Y receptors in a human neuroblastoma cell line. *J Neurochem* 1990; 55: 506-13.
23. Fisher SK, Landon RE. Identification of multiple phosphoinositide-linked receptors on human SK-N-MC neuroepithelioma cells. *J Neurochem* 1991; 57: 1599-608.
24. Sidhu A, Olde B, Humblot N, Kimura K, Gardner N. Regulation of human D1 dopamine receptor function and gene expression in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuroscience* 1999; 91: 537-47.
25. Chan AS, Ng LW, Poon LS, Chan WW, Wong YH. Dopaminergic and adrenergic toxicities on SK-N-MC human neuroblastoma cells are mediated through G protein signaling and oxidative stress. *Apoptosis* 2007; 12: 167-79.
26. Chen J, Rusnak M, Luedtke RR, Sidhu A. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J Biol Chem* 2004; 279: 39317-30.
27. Sheriff S, Qureshy AF, Chance WT, Kasckow JW, Balasubramaniam A. Predominant role by CaM kinase in NPY Y₁ receptor signaling: involvement of CREB. *Peptides* 2002; 23: 87-96.
28. Bahouth SW, Sowinski KM, Lima JJ. Regulation of human β 1-adrenergic receptors and their mRNA in neuroepithelioma SK-N-MC cells: effects of agonist, forskolin, and protein kinase A. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1211-20.
29. Chan AS, Yeung WW, Wong YH. Integration of G protein signals by extracellular signal-regulated protein kinases in SK-N-MC neuroepithelioma cells. *J Neurochem* 2005; 94: 1457-70.
30. Recuero M, Serrano E, Bullido MJ, Valdivieso F. A β production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Lett* 2004; 570: 114-8.
31. Sebastia J, Pertusa M, Vilchez D, *et al.* Carboxyl-terminal fragment of amyloid precursor protein and hydrogen peroxide induce neuronal cell death through different pathways. *J Neural Transm* 2006; 113: 1837-45.
32. Sopher BL, Fukuchi K, Smith AC, Leppig KA, Furlong CE, Martin GM. Cytotoxicity mediated by

- conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the β -amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 26: 207-17.
33. Hyun DH, Lee M, Hattori N, *et al.* Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* 2002; 277: 28572-77.
 34. Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA. Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *J Neurosci* 1999; 19: 7289-99.
 35. Priel A, Silberberg SD. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X₄ receptor channels. *J Gen Physiol* 2004; 123: 281-93.
 36. von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 415-32.
 37. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 281-341.
 38. Marteau F, Le Poul E, Communi D, *et al.* Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 104-12.
 39. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, *et al.* Identification of a novel human ADP receptor coupled to G_i. *J Biol Chem* 2001; 276: 41479-85.
 40. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 969-73.
 41. White PJ, Webb TE, Boarder MR. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1356-63.
 42. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 2006; 452: 513-37.
 43. Jones CA, Vial C, Sellers LA, Humphrey PP, Evans RJ, Chessell IP. Functional regulation of P2X₆ receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel α,β -methylene ATP-sensitive phenotype. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 979-85.
 44. Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 1995; 48: 178-83.
 45. Bo X, Jiang LH, Wilson HL, *et al.* Pharmacological and biophysical properties of the human P2X₅ receptor. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1407-16.
 46. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 5482-86.
 47. Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE, Stuhmer W. Characterization of recombinant human P2X₄ receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 109-18.
 48. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 1447-56.
 49. Le KT, Babinski K, Seguela P. Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 1998; 18: 7152-59.
 50. Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X₁ and P2X₄ subunits. *J Neurochem* 2005; 92: 925-33.
 51. Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stuhmer W. P2X₄: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3684-8.
 52. Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 1995; 375: 129-33.
 53. Inoue K, Tsuda M, Koizumi S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X₄. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 112-4.
 54. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, *et al.* P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424: 778-83.
 55. Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ. Expression of P2X₄ receptor by lesionally activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 2005; 163: 120-7.
 56. Cavaliere F, Dinkel K, Reymann K. Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage. *Neuroscience* 2005; 136: 615-23.
 57. Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, *et al.* Up-regulation of P2X₂, P2X₄ receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 2003; 120: 85-98.
 58. Sim JA, Chaumont S, Jo J, *et al.* Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X₄ knock-out mice. *J Neurosci* 2006; 26: 9006-9.
 59. Moore D, Chambers J, Waldvogel H, Faull R, Emson P. Regional and cellular distribution of the P2Y₁ purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J Comp Neurol* 2000; 421: 374-84.
 60. Moore D, Iritani S, Chambers J, Emson P. Immunohistochemical localization of the P2Y₁ purinergic receptor in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2000; 11: 3799-803.
 61. Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, *et al.* Hetero-oligomerization of the P2Y₁₁ receptor with the P2Y₁

receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y₁₁ receptor. *Biochem J* 2008; 409: 107-16.

62. Yoshioka K, Nakata H. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 88-94.



UPLC/Tandem mass and antimicrobial activity of *Khaya senegalensis* (A.Juss.)

Title in Spanish: UPLC/Tándem masa y la actividad antimicrobiana de *Khaya senegalensis*

Elsayed A. Aboutabl¹, Sahar S. El-Souda^{2*}, Amal A. Maamoun^{3*}, Fatma A. Hashem³, Maysa E. Moharam⁴

¹Pharmacognosy Dept, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Kasr-el-Aini street, Cairo, Egypt. 11562. ²Chemistry of Natural Compounds Dept, National Research Centre, 33 Bohouth Street, Dokki, Giza, Egypt, 12622. ³Pharmacognosy Dept, National Research Centre, 33 Bohouth Street, Dokki, Giza, Egypt, 12622. ⁴Microbial chemistry Dept, National Research Centre, 33 Bohouth Street, Dokki, Giza, Egypt, 12622.

ABSTRACT: Characterization of flavonoids and limonoids in the defatted acetone extract of *Khaya senegalensis* flowers (A. Juss.) contents was performed using ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled with ultraviolet (UV) and electrospray ionization (ESI) mass spectrometry, furthermore, tandem mass spectrometry (MS/MS) was performed to assist in the structural elucidation. The antimicrobial effect was tested against representative gram positive and negative bacteria and candida. Cytotoxicity of extract was evaluated using the mitochondrial-dependent reduction of MTT. The method used enabled identification of five flavonoid glycosides (di and mono-sugar) and twelve limonoids of different types viz: mexicanolides, phragmalins and angolensate were tentatively identified. The extract was effective against tested microorganism revealing potent growth inhibitory effect on *Salmonella typhimurium* ATCC 25566, *Escherichia coli* NRRN 3008, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and fungus *Candida albicans* EMCC105, MIC $\leq 25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ while MIC $\leq 50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for *Bacillus cereus*, *staphylococcus aureus* ATCC 6538. Extract showed cytotoxicity against MCF7 (Breast carcinoma cell line) compared to doxorubicin, IC₅₀=88.1($\mu\text{g}/\text{mL}$) but no activity on HCT 116 (Colon carcinoma cell line) and HepG2 (liver cell carcinoma) was observed. Bioactive compounds in *K senegalensis* flowers acetone extract possesses promising antimicrobial activity with low cytotoxic effect warrants further investigation for their therapeutic and prophylactic roles.

RESUMEN: Se ha procedido a la caracterización de los flavonoides y limonoides del extracto acetónico de las flores de la especie *Khaya senegalensis* (A. Juss.) El análisis de sus componentes se realizó mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) con detección ultravioleta (UV) y de espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI), así como espectrometría de masas (MS / MS) para ayudar en la elucidación estructural de los compuestos. Se comprobó el efecto antimicrobiano en bacterias gram positivas y negativas y levaduras como el genero *Candida*. La citotoxicidad del extracto se evaluó mediante la reducción mitocondrial dependiente de MTT. El método de análisis permitió la identificación de cinco glucósidos flavonoides (di y mono-azúcar) y doce limonoides de diferentes tipos: se identificaron tentativamente mexicanolidos, phragmalinas y angolensato. El extracto fue efectivo contra microorganismos ($\leq \text{MIC } 25\mu\text{g} / \text{l}$), revelando potente efecto inhibitor del crecimiento de *Salmonella typhimurium* (ATCC 25566), *Escherichia coli* (NRRN 3008), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y el hongo *Candida albicans* (EMCC105). Igualmente fue eficaz a MIC $\leq 50\text{ mg} / \text{l}$ sobre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Igualmente, el extracto mostró citotoxicidad contra línea celular de carcinoma de mama (MCF7) en comparación con la doxorubicina, (IC₅₀ = 88.1 ($\mu\text{g} / \text{mL}$), pero no modificó la actividad en una línea celular de carcinoma colon (HCT 116) y en células de carcinoma del hígado (HepG2). Los compuestos bioactivos en extracto acetónico de flores de *K. senegalensis* poseen una actividad antimicrobiana prometedora con bajos efectos citotóxicos que garantizan la necesidad de una mayor investigación para conocer completamente sus papeles terapéuticos y profilácticos.

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 3 (2015), pp. 258-265

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

Language of Manuscript: English

*Corresponding Authors: saharchem@yahoo.com, amalbdelrshid@yahoo.com

1. INTRODUCTION

Limonoids exhibited broad biological activities; such as: insect- antifeedant, growth-regulating activity on insects, antimicrobial, anticancer, antiviral and other

pharmacological activities. Limonoids have been isolated from several plants; their occurrence in the plant kingdom being abundant in families, Meliaceae and Rutaceae. Those in Rutaceae are structurally less complicated, being

generally limited to the modification of A and B rings. On the other hand, Meliaceae limonoids are characterized by high degree of oxidation and rearrangement exhibited in the parent limonoid structure (1).

Ultra performance liquid chromatography (UPLC) has been one of the important physicochemical methods for identification of constituents in plant extracts, due to its rapidity, sensitivity, and low levels of the sample needed (2).

UPLC–UV analysis usually does not provide sufficient information necessary to distinguish between structural isomers. UPLC equipped with ESI /MS method could be useful in the characterization of these compounds. Data dependent tandem mass spectrometry (MS/MS) was performed to assist in the structural elucidation of both aglycones and glycosidic conjugates, as well as the structures of limonoids.

Anti-microbial has been and will continue to prioritize the health needs in all communities. Particularly, when we encounter the emergence of microbes resistance to antibiotics as result of their overuse. Which makes the search for safe and effective alternatives as essential needs. *Khaya senegalensis*, one of Meliaceae plants, have long been used in folk medicine. Flowers are used in medicines against stomach complaints and syphilis. (3). Although, the chemical composition of leaves, bark and seeds have been studied (4, 5), according to our knowledge no phytochemical neither biological studies of flowers were reported. This study attempt to investigate their flavonoids and limonoids constituents as well as antimicrobial and cytotoxic activity.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemicals and reagents

Acetonitrile and formic acid (LC/MS grade) were obtained from J. T. Baker (Deventer, The Netherlands), milliQ water was used for UPLC analysis. Rutin, isoquercitin, isorhamnetin, kaempferol-3-O- β -D-rutinoside, umbelliferone and kaempferol were obtained from Chromadex (Wesel, Germany). All other chemicals and standards were provided from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS), (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT), Doxrubicin (DOX) (Pharmacia, Belgium).

2.2. Plant material

Khaya senegalensis (A. Juss) flowers were collected during April-May from Giza Zoo, Egypt. Plant specimens are deposited at Faculty of pharmacy-Cairo University (voucher No.: 10-6-2014a).

2.3. Plant extraction

The shadow dried powdered flowers (100g) were defatted with petroleum ether then extracted with acetone, the acetone was evaporated under vacuum till dryness to afford brown residue (20gm).

Acetone fraction of defatted powder of *Khaya senegalensis* (A. Juss) flowers (20 ± 0.06 mg) was extracted with 1.8 mL aq.80% MeOH for 10 hours using an orbital shaker in the dark. 1 mg of extract was dissolved in 1 mL 100% MeOH. The extract was spiked with (20 μ g) umbelliferone as a standard. After sonification for 2 min., sample was centrifuged at 13000 rpm for 3 minutes to remove insoluble material, supernatant was injected.

2.4. High resolution UPLC-PDA-MS analysis

Chromatographic separations were performed on an Acquity UPLC system (Waters) equipped with a HSS T3 column (100×1.0 mm, particle size 1.8 μ m; Waters) applying two elution binary gradients at a flow rate of 150 μ L min⁻¹: (1) 0 - 1 min, isocratic 95% A (water/formic acid, 99.9/0.1 (v/v)), 5% B (acetonitrile/formic acid, 99.9/0.1 (v/v)); 1 - 16 min, linear from 5 to 95% B; 16 - 18 min, isocratic 95% B; 18 - 20 min, isocratic 5% B. The second binary eluent (2) was composed of ammonium acetate 50 mM buffer adjusted to pH 5(A) and 100% acetonitrile (B) using the same elution gradient as above. The injection volume was 3.1 μ L (full loop injection). Eluted compounds were detected from m/z 100 to 1000 using a MicrOTOF-Q hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics) equipped with an Apollo II electrospray ion source negative ion mode using the following instrument settings: nebulizer gas, nitrogen, 1.6 bar; dry gas, nitrogen, 6 L min⁻¹, 190°C; capillary, 5500 V (+4000 V); end plate offset, 500 V; funnel 1 RF, 200 Vpp; funnel 2 RF, 200 Vpp; in-source CID energy, 0 V; hexapole RF, 100 Vpp; quadrupole ion energy, 5 eV; collision gas, argon; collision energy, 10 eV; collision RF 200/400 Vpp (timing 50/50); transfer time, 70 μ s; prepulse storage, 5 μ s; pulser frequency, 10 kHz; spectra rate, 3 Hz. Internal mass calibration of each analysis was performed by infusion of 20 μ L 10 mM lithium formate in isopropanol/water, 1/1 (v/v), at a gradient time of 18 minutes using a diverter valve. Compounds were characterized by their UV-vis. spectra (220-600 nm), retention times relative to umbelliferone, mass spectra and comparison to our in-house database and reference literature (6).

2.4. Tandem mass spectrometry (MS–MS)

MicrOTOF-Q: Precursor ions were selected and fragmented in the collision cell applying collision energies in the range of 10–30 eV. Argon was used as collision gas. Product ions were detected using the following parameter settings: pulser frequency, 10 kHz; spectra rate, 1.5 Hz. For CID of in-source fragment ions, in-source CID energy was increased from 0 to 100 V. Ion Trap MS: MSⁿ mass spectra were also obtained from a LCQ Deca XP MAX system (ThermoElectron, San Jose, USA) equipped with a ESI source (electrospray voltage 4.0 kV, sheath gas: nitrogen; capillary temperature: 275 °C) in negative ionization modes. The Ion Trap MS system is coupled with the exact Waters UPLC setup and using same elution gradient. The MSⁿ spectra were recorded by using the

following conditions: MS/MS analysis with starting collision-induced dissociation energy of 30 eV, negative ionization mode.

2.5. Antimicrobial assay

The antibacterial and antifungal activities were carried out in the Microbial Department, National Research center, using the disc diffusion method (7). A filter paper sterilized disc saturated with measured quantity (20 µl) of the sample (5mg/ml) (100µg/disc) is placed on a plate (9 cm diameter) containing a solid bacterial medium (nutrient agar) or a fungal medium (potato dextrose agar) which has been seeded with the spore suspension of the test organism. Incubation was at 37°C, 24 h for bacteria and at 28°C, 72 h for fungi. All measurements were done in methanol as a solvent which has zero inhibition activity. The antimicrobial activity of the tested compounds were examined with gram positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, and gram negative bacteria *Salmonella typhimurium* ATCC 25566, *Escherichia coli* NRRN 3008 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and fungus *Candida albicans* EMCC105. The obtained results are compared with the reference antibiotics 20 µl from 5mg/ml solution Cephadrine (Bristol Myers-Squibb) and Ketoconazole (*Janssen Pharmaceutica NV*), (100µg/disc). All these steps were carried out under aseptic conditions. The test was carried out in triplicates. The diameter of the clear zone of inhibition surrounding the sample is taken as a measure of the inhibitory power of the sample against the particular test organism according the following equation: % inhibition = sample inhibition zone (cm) / plate diameter (cm) x 100). The Minimum Inhibition Concentration (MIC) was determined after incubation of the bacterial strains at 37 °C for 24 h and the fungal strain at 28 °C for 72 h in the presence of serial dilutions of the test compounds. Each MIC experiment was repeated three times. The MIC was defined as the lowest concentration at which no visible growth was observed.

2.6. Statistical analysis

The results obtained in all analyses were expressed in mean of three ±SE (standard error). Student's *t*-test using GraphPad QuickCalcs on line Software, Inc. CA, US A. by comparing the inhibition zones of samples to those of antibiotics Statistical significance was set at *P* <0.01.

2.7. In vitro assessment of cytotoxicity

Cell viability was assessed by the mitochondrial dependent reduction of yellow MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to purple formazan (8). All the following procedures were done in a sterile area using a Laminar flow cabinet biosafety class II level (Baker, SG403INT, Sanford, ME, USA). Cells were suspended in RPMI 1640 medium for MCF7 (Breast carcinoma cell line) HCT 116 (Colon carcinoma cell line) and HEPG2 (liver cell carcinoma). The media are supplemented with 1% antibiotic-antimycotic

mixture (10,000U/ mL Potassium Penicillin, 10,000µg/ml Streptomycin Sulphate and 25µg/mL Amphotericin B), 1% L-glutamine and 10% fetal bovine serum and kept at 37 °C under 5% CO₂. Cells were batch cultured for 10 days, then seeded at concentration of 104 cells/well in fresh complete growth medium in 96-well microliter plastic plates at 37 °C for 24 hours under 5% CO₂ using a water jacketed Carbon dioxide incubator (Sheldon, TC2323, Cornelius, OR, USA). Media was aspirated, (without serum) fresh medium was added and cells were incubated either alone (negative control) or with different concentrations of sample (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 and 0.78 µg/mL), Doxorubicin was used as reference drug at aforementioned concentration; triplicate being prepared for each individual dose. After 48 hours of incubation, medium was aspirated, 40µL MTT salt (2.5µg/mL) were added to each well and incubated for further four hours at 37°C under 5% CO₂. To stop the reaction and dissolving the formed crystals, 200 µL of 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS) in deionized water was added to each well and incubated overnight at 37°C. A positive control which composed of 100µg/mL was used as a known cytotoxic natural agent (*Annona cherimola* leaves) who gives 100% lethality under the same conditions (9). The absorbance was then measured using a microplate multi-well reader (Bio-Rad Laboratories Inc., model 3350, Hercules, California, USA) at λ 595 nm and a reference wavelength at λ 620 nm. A statistical significance was tested between samples and negative control (cells with vehicle) using independent *t*-test by SPSS 11 program. DMSO is the vehicle used for dissolution of plant extracts and its final concentration on the cells was less than 0.2%. The percentage of change in viability was calculated according to the formula: (1- (Reading of extract / Reading of negative control)) x 100.

3. RESULTS

3.1. UPLC of acetone extract

The UPLC profile for monitoring the separation process is illustrated in (Figure 1) the compounds tentatively identified from mass are compiled in (Table 1). The elution order followed a sequence of decreasing polarity, whereby flavonoid diglucosides eluted first, followed by monoglucosides then free aglycones and highly oxygenated triterpenoids.

3.2. Antimicrobial effect of acetone extract

As shown in Table 2 the tested extract is clearly active against gram negative bacteria represented by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* reaching 100% the activity of the reference antibiotic followed by the gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (90%). At the same time our extract exhibited antimicrobial activity against gram positive bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* with inhibitory effect of two thirds the reference antibiotic. With respect to *Candida albicans* the tested extract exerts mild activity against this pathogen. These results are of great value to biological applications

thus they encouraged us to study the minimal inhibitory concentration (MIC) of the extract against each microbial organism (Table 2). The obtained results revealed that MIC of the tested extract was about 5 μ L (25 μ g) per disc against gram negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*, in addition to the yeast pathogen *Candida albicans*. Meanwhile, MIC against gram positive bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* ranged 5 μ L (25 μ g) $\geq$ 10 μ L (50 μ g) per disc. These results confirm the stronger inhibitory effect of the extract against gram negative bacteria as the smaller the MIC the stronger antimicrobial effect.

3.3. Cytotoxicity of acetone extract

The acetone extract was tested *in-vitro* on human carcinoma cell line (HepG2 – MCF7 – HCT 116). The concentration of extract that is required for 50% inhibition in cell viability (IC₅₀) against MCF7 was IC₅₀ = 88.1 (μ g/mL), compared to Doxorubicin IC₅₀ = 26.1 (μ g/mL), but neither HEPG2 nor HCT 116 cell lines were inhibited at tested concentrations.

4. DISCUSSION

Coupling of liquid chromatography (LC) with ultraviolet (UV) and electrospray ionization (ESI) mass spectrometric has been demonstrated as a powerful tool for the identification of compounds in plant extracts (10). The method described in our study allowed identification of seventeen compounds from *Khaya senegalensis* flowers.

Flavonoids

UV absorption of flavonoids shows the two characteristic maxima in the ranges $\lambda_{\max}$ 240-285 nm (band II) and 300-370 nm (band I) (11).

Five flavonoid glycosides (di and mono-sugar) were identified. Quercetin glycosides were isolated before from *Khaya senegalensis* (A. Juss.) leaves (12), while this is the first report of luteolin and isorhamnetin glycosides in this plant. The neohesperidoside sugar moiety (rhamnoglucoside 1 $\rightarrow$ 2)) in compound 1 is concluded from fragment at m/z 505 (M-H-120)⁻ characteristic for the neohesperidoside sugar rather than rutinoside (rhamnoglucoside (1 $\rightarrow$ 6)) (13). UV absorption of compound 1 at $\lambda_{\max}$ 370 nm (band I) indicates presence of free 3-OH suggesting the attachment of sugar moiety at 7-O-. On the other hand, compounds 2, 3 and 5 showed band I UV absorption at $\lambda_{\max}$ range 350-355 nm indicating substituted 3- OH flavonol. So they were identified as isorhamnetin-3-O neohesperidoside, quercetin-3-O-rutinoside and quercetin-3-O- rhamnoside, respectively.

Peaks at m/z 479 and m/z 463 for isorhamnetin neohesperidoside and rutin, respectively, were due to sequential loss of terminal sugar moiety (rhamnose) before loss of the other moiety (glucose) and give base peak at m/z 315 and m/z 301 representing the two aglycones respectively.

Limonoids

Furthermore, 12 limonoids were tentatively identified,

viz: mexicanolides, phragmalins (as khayanolides) and angolensate, based on exact masses, fragmentation pathways, elemental constituents and phytochemical dictionary of natural products database. The UV absorptions at $\lambda_{\max}$ 250-290 nm are due to the transition interaction between two chromophores of the unsaturated lactone and the furan ring in limonoid compounds (5). A common feature was observed, in the mass fragmentation of limonoids, which are characterized by the loss of a major fragment m/z 44 to give a base peak referred to (M-H-CO₂)⁻ resulting from ring cleavages of cyclic anhydride, other common fragments were m/z (M-H-60)⁻ and (M-H-88)⁻ resulting from loss of C₂O₂H₄ and C₃O₃H₄, respectively. Mexicanolide type limonoid had characteristic fragment m/z (M-H-28)⁻, due to the loss of intramolecular carbonyl group.

Compounds were identified for the first time in *K. senegalensis* flowers Table (1); amongst them, some were previously reported from other organs of *K. senegalensis* such as pentahydroxy-oxo-tricyclomeliacate and khayane (mexicanolide type) have been reported before from stem bark (14,15), while the acetyl derivative of the former in addition to khayanolides and khayeneganins (phragmalin type), have been previously isolated from stem bark, leaves and twigs (5,16), furthermore, 2-hydroxymexicanolide and destigloylswietenin have been isolated from *K. senegalensis* seeds (17). On the other hand, 6, 8-dihydroxycarapin have been isolated before from *K. anthotheca* (18).

Acetone extract of *K. senegalensis* flowers showed moderate activity against MCF7 (Breast carcinoma cell line) compared to doxorubicin, with no activity on HCT 116 (Colon carcinoma cell line) and HEPG2 (liver cell carcinoma). The results implied a selective cytotoxicity of *K. senegalensis* (A.Juss.) flowers acetone extract, which is in accordance with that reported for limonoids from *Citrus reticulata* (19). However, *Khaya senegalensis* Bark Extract was reported to inhibit growth of HT-29, HCT-15 and HCA-7 Colorectal cancer cells with IC₅₀ (1.00, 0.30, 0.22 μ g/ μ l) respectively (20). Moreover, *K. senegalensis* flowers oil displayed cytotoxic activity against HepG-2, MCF-7 and HCT-116 cell lines with LC₅₀ (61.1, 79.7, 61 ppm) respectively (21).

Adebayo and Osman, (22) tested the antimicrobial effect of 200 mg/ml *Khaya Senegalensis* ethanol stem bark extract against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, they found the zone of inhibition = 20.10 and 17.10 mm respectively. Preceding study reported the MIC values were ranged from 390.63 to 1560 μ g/mL for *Khaya senegalensis* bark aqueous acetone extract (23). In fact, a deferential cytotoxic and antimicrobial effect of flavonoids and limonoids depend on several factors: Their chemical structure, concentration, and also on the type of cancer cell lines or the microorganisms revealing somewhat different sensitivity toward different compounds (1,24- 26).

5. CONCLUSION

This is the first report of flavonoids and limonoids

from *k. senegalensis* flowers. The method used enabled identification of five flavonoid glycosides and twelve limonoids of different types viz: mexicanolides, phragmalins and angolensate. Pathogens developed resistance to antibiotics is one of very common health problem for human infectious diseases. Being ethnomedically used for treating infection such as diarrhea, wounds and syphilis the results deserve further biochemical studies of extracts from the flowers for their potential medicinal significance.

6. CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

7. ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to Dr. M. Farag for the UPLC-MS analysis in (Leibniz Institute for Plant Biochemistry, Halle, Germany). Special gratitude for Miss Therese Labib and Dr. M.El-Gibali plant taxonomy consultants at the Ministry of Agriculture, Giza, Egypt for authentication of the plant specimens. The work was funded by National Research Centre, Dokki, Giza, Egypt. Through a PhD grant No. 2/5/10.

8. REFERENCES

- Roy A, Saraf S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plant kingdom. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(2): 191-201
- Yang W, Fang D M, He HP, Hao XJ, Wu ZJ, Zhang GL. Analysis of mexicanolide- and phragmalin-type limonoids from *Heynea trijuga* using high-performance liquid chromatography/ electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2013;27: 1203–1212 2 15.
- Nikiema A, Pasternak D. *Khaya senegalensis* (Desr.)A.Juss. (Internet) Record from PROTA4U.Louppe D , Oteng-Amoako, AA and Brink M (Editors).PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, 2008. Netherland. Available from <<http://www.prota4u.org/search.asp>>. Accessed 30 October 2014.
- Adesida GA, Adesogan EK, Okorie DA, Taylor DAH, Styles BT. Limonoid chemistry of the genus *Khaya* (Meliaceae). *Phytochemistry* 1971; 10: 1845-53.
- Yuan CM, Zhang Y, Tang GH, Di YT, Cao MM, Wang XY, Zuo G, Li SL, Hua HM, He HP, Hao XJ. Khayseneganins A–H, Limonoids from *Khaya senegalensis*. *J Nat Prod* 2013; 76 (3): 327–333.
- Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2003;1016: 195–209.
- Muanza DN, Kim BW , Euler KL , Williams L. Antibacterial and Antifungal Activities of Nine Medicinal Plants from Zaire. *Int J Pharmacog* 1994;32: 337.
- Mosmann T. Rapid colourimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Thabrew, MI, Hughes RD, McFarlane IG. Screening of hepatoprotective plant components using a HEPG2 cell cytotoxicity assay. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 1132-5.
- Niessen WMA, Tinke AP. Liquid chromatography–mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J. Chromatogr A* 1995; 703: 37–57.
- Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press: London. 1982.
- Mesbah MK, Abd El-Hafiz MA , El-Shanawany MA. Pharmacognostic study of *Khaya senegalensis* A. Juss growing in Egypt. 1: Botanical and chemical study of the leaf. *Bull Pharm Sci* 1984; 7: 207-223.
- Liu EH, Qi LW, Ping Li JC, Li CY, Peng YB. Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules* 2008;13: 2521-2544
- Nakatani M, Abdelgaleil SAM, Okamura H, Iwagawa T, Sato, A, Doe M. B. Limonoids from an Egyptian mahogany *Khaya senegalensis*. *Tennen. Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* 2000;42: 37-42.
- Olmo RV, Fatima M, Das GF, Da Silva Fo ER, Vieira PC, Fernandes JB, Marsaioli AJ, Pinheiro AL , Vilela EF. Rearranged limonoids from *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry* 1996;42(3): 831-837.
- Nakatani M, Abdelgaleil SAM, Okamura H, Iwagawa T.; Sato A, Doe M. A Khayanolides A and B, new rearranged phragmalin limonoid antifeedants from *Khaya senegalensis*. *Tetrahedron Let* 2000; 41 (33): 6473-6477.
- Govindachari TR, Kumari GN. Tetraterpenoids from *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry* 1998; 47(7): 1423-1425.
- Tchimene MK, Tane P, Ngamga D, Connolly JD, Farrugia LJ. Four tetranortriterpenoids from the stem bark of *Khaya anthotheca*, *Phytochemistry* 2005; 66: 1088-1093
- Tian Q, Miller EG, Ahmad H, Tang L, Patil BS. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr Cancer* 2001;40 (2):18.
- Androulakis XL, Muga SJ, Chen F, Koita Y, Tour B, Wargovich MJ. Chemopreventive Effects of *Khaya senegalensis* Bark Extract on Human Colorectal Cancer. *Anticancer research* 2006; 26: 2397-2406.
- ElSouda S, Mammoun A, Hashem F, Aboutab EA. In vitro cytotoxic activity of essential oil from khaya species flowers.The 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research . 2013. Münster, Germany, 1st – 5th September 2013 . *Planta Med* . 2013;79 :P 136. DOI: 10.1055/s-0033-1352126.Congress abstract.
- Adebayo OL, Osman K. A comparative evaluation of in vitro growth inhibitory activities of different

solvent extracts of some medicinal plants in Northern Ghana against selected human pathogens. IOSR J. Pharm. 2012; 2(2) : 199–206.

23. Konaté K, Kiendrébéogo M, Ouattara M B, Souza A, Lamien-Meda A, Nongasida Y, Barro N, Millogo-Rasolodimby J, Nacoulma OG. Antibacterial Potential of Aqueous Acetone Extracts From Five Medicinal Plants used Traditionally to Treat Infectious Diseases in Burkina Faso Curr. Res. J. Biol. Sci., 2011; 3(5): 435-442.
24. Kikuchi T, Ishii K, Noto T, Takahashi A, Tabata K, Suzuki T, Akihisa T. Cytotoxic and apoptosis-

inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (neem). J Nat Prod. 2011 ;74(4):866-70. doi: 10.1021/np100783k

25. Kumar S, Pandey A K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal, 2013, ID 162750, 16 pages, 2013. doi:10.1155/2013/162750
26. Sak K. 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. Pharmacogn Rev. 8(16): 122–146.

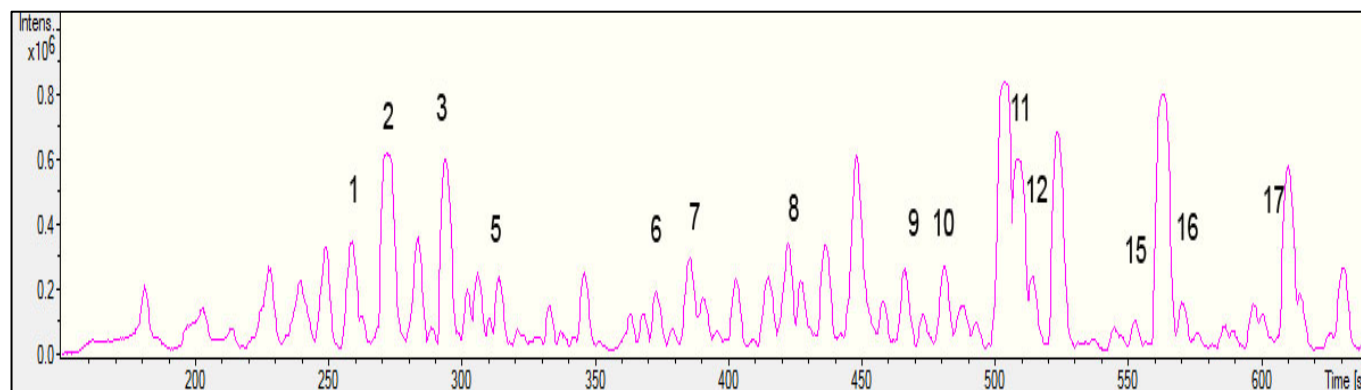


Figure 1. UPLC/ MS chromatogram of *Khaya senegalensis* (A.Juss.) flowers acetone fraction.

Table (1): UPLC/ MS-Tandem/Mass of *Khaya senegalensis* (A.Juss.) flowers acetone extract.

NO	Rt. (sec.)	UV (nm)	Mol. ion m/z [M-H] ⁻	Element composition	Identified compounds	Error (ppm)	MS/MS
1	247.7	267 305 370	625.1405	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	Isorhamnetin <u>neohesperidoside</u>	1.0	316 [M-H- <u>neohesperidoside</u>] ⁻ 505[M-H-120] ⁻
2	272.6	255 265 353	609.1469	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	<u>Rutin</u>	1.2	301 [M-H- <u>rutinoside</u>] ⁻
3	285.0	264, 355	593.1518	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	<u>Luteolin rutinoside</u>	1.1	285 [M-H- <u>rutinoside</u>] ⁻
4	294.2	N.D.	463.0000	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	Quercetin glucoside	--	301[M-H-glucoside] ⁻
5	305.3	256 297 350	447.0932	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Quercetin <u>rhamnoside</u>	0.2	301[M-H- <u>rhamnoside</u>] ⁻
6	368.0	288	515.1921	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₀	<u>Khayanolide A^b</u>	0.4	471[M-H-CO ₂] ⁻ 455[M -H-C ₂ O ₂ H ₄] ⁻ 427[M-H-C ₃ O ₃ H ₄] ⁻

7	390.5	279	533.2024	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₁	1, 6, 8, 14,30-Pentahydroxy-3-oxo [3.3.1 ^{10,2,1} ^{1,4}]tricyclomeliac-7-oic acid Methyl ester. ^a	0.8	515[M-H-H ₂ O] ⁻ 505[M-CO] ⁻ 487 [M-H-H ₂ O-CO] ⁻ 445 [M-H- C ₃ O ₃ H ₄] ⁻ 401 [M-H-2H ₂ O-furanoyl] ⁻
8	415.1	282	559.2182	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₁	1- Acetylkhavanolide B. ^b	0.5	516[M-H-C ₂ OH ₃] ⁻ 515[M-H-CO ₂] ⁻ 497 [M-H- CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 471 [M-H- C ₃ O ₃ H ₄] ⁻
9	473.0	284	575.2132	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₂	1-acetyl-1,6,8,14,30- Pentahydroxy-3- oxo[3.3.1 ^{10,2,1} ^{1,4}]tricyclomeliac- 7-oic acid Methyl ester. ^a	0.6	532[M-H-C ₂ OH ₃] ⁻ 531 [M-H-CO ₂] ⁻ 515[M-H-C ₂ O ₂ H ₄] ⁻
10	481.1	278	557.2028	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₁	Khavanolide E. ^b	0.8	513[M-H-CO ₂] ⁻ 497[M-H- C ₂ O ₂ H ₄] ⁻ 469[M-H- C ₃ O ₃ H ₄] ⁻
11	509.0	280	559.2192	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₁	2-Hydroxy, 8 α ,30 α -epoxide, 3- acetyl, detiglovswietenine. ^c	-1.3	515[M-H- CO ₂] ⁻ 471 [M-H- C ₃ O ₃ H ₄] ⁻
12	514.4	275	485.2174	C ₂₇ H ₃₃ O ₈	Detiglovswietenine. ^c		467[M-H-H ₂ O] ⁻ 441[M-H-CO ₂] ⁻ 397[M-H- C ₃ O ₃ H ₄] ⁻ 379[M-H- C ₃ O ₃ H ₄ -H ₂ O] ⁻
13	531.0	N.D.	471.0000	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	6-Hydroxy angolensic acid	---	453[M-H-H ₂ O] ⁻ 427[M-H-C ₂ H ₄ O] ⁻ 409[M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 331[M-H-CO ₂ -furan part] ⁻
14	535.0	N.D.	483.0000	C ₂₇ H ₃₂ O ₈	2-hydroxy Mexicanolide	---	439[M-H-CO ₂] ⁻
15	537.0	270	547.2174	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₁	Khavseneganin F. ^b	2.5	529[M-H- H ₂ O] ⁻ 487[M-H- C ₂ O ₂ H ₄] ⁻
16	570.0	278	499.1973	C ₂₇ H ₃₁ O ₉	6,8 -Dihydroxycarapin. ^c	0.0	455[M-H-CO ₂] ⁻ 411[M-H- C ₃ O ₃ H ₄] ⁻
17	589.5	284	501.2118	C ₂₇ H ₃₃ O ₉	Khavanone (6,8-Dihydroxy, 14,15-dihydrocarapin) ^c	2.4	457 [M-H-CO ₂] ⁻

N.D.: Not detected Rt.: Retention time

^a: Phragmalin type^b: Rearranged phragmalin type^c: Mexicanolide type

Table (2): The antibacterial and antifungal activities of *Khaya* acetone extract

Microorganism	Inhibition zone (mm) (% inhibition)		MIC(μ g/disc)
	KAE * 100 μ g/disc	Reference drug 100 μ g/disc	
<i>Bacillus cereus</i> ^a	19 $\pm$ 0.57* ^f (21%)	30 $\pm$ 0.81 ^d (33%)	$\leq$ 50
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	19.66 $\pm$ 1.20* ^g (21%)	30 $\pm$ 0.34 ^d (33%)	$\leq$ 50
<i>Salmonella typhimurium</i> ^b	15 $\pm$ 1.15 (16%)	15 $\pm$ 0.47 ^d (16%)	$\leq$ 25
<i>Escherichia coli</i> ^b	20 $\pm$ 0.57* ^h (22%)	15 $\pm$ 0.40 ^d (16%)	$\leq$ 25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b	17 $\pm$ 0.57* ⁱ (18%)	20 $\pm$ 0.42 ^d (22%)	$\leq$ 25
<i>Candida albicans</i> ^c	25 $\pm$ 1.15* ^j (27%)	40 $\pm$ 0.33 ^e (44%)	$\leq$ 25

* *Khaya* acetone extract, Each value is mean of three replication of experiment $\pm$ SE Values between brackets are the % inhibition compared to control.

a: gram positive bacteria b: gram negative bacteria c: fungus d: Cephadrine e: Ketoconazole

Unshared superscript letters between groups are the significant values at (f: P = 0.0001, g: P = 0.0023, h: P = 0.0053, i: P = 0.0147, j: P = 0.0005)

*: Highly significant (P<0.01)



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Reiniciada la actividad académica tras el ralenti estival de los meses de julio y agosto, en el mes de septiembre se celebraron dos sesiones científicas, de la cuales una fue una conferencia y una Toma de Posesión de Académica Correspondiente, ambas organizadas por la sección 2ª.

El 17 de septiembre tuvo lugar la conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, sobre "DNDi: modelo y líneas prioritarias en leishmaniasis visceral" a cargo del Dr. Jorge Alvar, Jefe del programa de Leishmaniasis en *Drugs for Neglected Disease initiative* (DNDi). Ginebra, que fue presentado por el Académico de Número de la RANF el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

El Dr. Antonio R. Martínez, en su presentación habló sobre enfermedades tropicales desatendidas, dando a conocer de primera mano el estado en el mundo entero de una de ellas: la leishmaniasis.

La leishmaniasis y sus especies pertenecen a una rama separada, muy particular de los protistas que ahora se llaman excavados dado que cuentan siempre con un surco o saco a donde el batir de un flagelo conduce partículas alimenticias. Además de su interés sanitario, ya que algunos de ellos causan enfermedades mortales, este grupo de protistas destaca hoy por reunirse, en la hipótesis de los biólogos filogenistas, el hilo conductor primario de la diversificación de todos los eucariotas.

Uno de estos euglenozoos, las especies del género *Leishmania* son parásito permanente con dos hospedadores, el definitivo donde además se reproduce sexualmente, un insecto hematófago, los flebotomos y una serie de hospedadores intermediarios, vertebrados (reptiles y mamíferos) donde ocasionan graves enfermedades en células del sistema inmune.

Y las leishmaniosis humanas (enfermedades zoonóticas en su mayoría) son una de las 17 enfermedades etiquetadas por la OMS como olvidadas/desatendidas. Son un grupo de infecciones crónicas que afectan casi exclusivamente a las poblaciones pobres, con viviendas precarias, suciedad ambiental y abundancia de insectos y animales que mantienen y propagan alguna de ellas. Once de estas enfermedades son parasitismos.

La industria farmacéutica era reticente a nuevos desarrollos, pues resultaba muy difícil disponer de grandes inversiones donde no puede haber retorno que las pague y sostenga, sin hablar de beneficio. La movilización surgió de la feliz asociación de iniciativas públicas y privadas benéficas.

La primera respuesta vino de la ONG "Médicos sin fronteras" que destinó el importe de su Premio Nobel de 1999 a la creación de un modelo alternativo de investigación y desarrollo (I+D) de medicamentos frente a enfermedades olvidadas y en 2003 lanzó, asociada a seis entidades más la iniciativa de Medicamentos para enfermedades olvidadas (DNDi).

Uno de los proyectos de DNDi es la leishmaniasis, iniciativa de medicamentos frente a este conjunto de enfermedades que se dan en 98 países y que afecta a unos 350 millones de personas en todo el mundo. conferenciante invitado para hablar este día fue el Jefe del Programa de Leishmaniasis de la DNDi, el Dr. Alvar Ezquerro.

El Dr. Alvar, desde 1995 a 1999 fue el Jefe del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Contribuye a la formación de la SEMTS (Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional) de la que es Vicepresidente primero y Presidente (2000) y logra que se cree dentro del IS Carlos III, el Centro Nacional de Medicina Tropical del que fue su primer director (2000 al 2004).

Termina así su etapa de 23 años al servicio del IS Carlos III, y se traslada a Ginebra para desempeñar del 2004 al 2012 la jefatura del programa de control de la leishmaniosis en el Departamento de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la OMS. Terminado este periodo pasa a su actual misión como Jefe del Programa de Leishmaniosis de la DNDi.

Tras la presentación del Dr. Antonio R. Martínez, tomó la palabra el Dr. Jorge Alvar que habló sobre:

DNDi: modelo y líneas prioritarias en leishmaniasis visceral.

La Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi) es una organización de investigación y desarrollo sin

finances de lucro que trabaja para brindar nuevos tratamientos para las enfermedades desatendidas, especialmente la leishmaniasis, la tripanosomiasis africana humana, la enfermedad de Chagas, la malaria, las infecciones específicas causadas por filarias, y el VIH pediátrico. Desde su creación en 2003, DNDi ha proporcionado seis nuevos tratamientos: dos antimaláricos de dosis fija (ASAQ y ASMQ), un tratamiento combinado de nifurtimox y eflornitina (NECT) para la enfermedad del sueño en etapa avanzada, un tratamiento combinado de estibogluconato de sodio y paromomicina (SSG y PM) para la leishmaniasis visceral en África, un conjunto de tratamientos combinados para la leishmaniasis visceral en Asia, y una forma farmacéutica pediátrica de benznidazol para la enfermedad de Chagas. Su modelo de interacción con la industria farmacéutica es innovador, habiendo tejido una red virtual con más de 700 colaboradores directos. Además, DNDi ha establecido plataformas regionales específicas para cada enfermedad, que reúne socios en países con enfermedades endémicas para fortalecer la capacidad de investigación clínica existente, así como para generar nuevas capacidades allí donde sea necesario. La leishmaniasis visceral supone un componente esencial en el portafolio de DNDi. Con el propósito de identificar el mejor tratamiento posible para esta enfermedad se han realizado ensayos de combinaciones con los medicamentos disponibles en Asia, este de África y América, habiendo proporcionado a las autoridades sanitarias las evidencias científicas para establecer las recomendaciones internacionales y nacionales. Las formas complicadas por co-infección con VIH es un aspecto de suma importancia para DNDi tanto en Etiopía como la India. Desde el punto de vista de la salud pública se están avanzando estudios para comprender el papel que juegan los portadores asintomáticos y enfermos de PKDL en la transmisión de la leishmaniasis, para desarrollar medicamentos específicos que contribuyan a la prevención. La limitación de eficacia y/o toxicidad que presentan los medicamentos actuales hace que DNDi encare la nueva década enfocada en el desarrollo de nuevas entidades químicas orales que puedan ser utilizadas en combinación en áreas remotas de difícil acceso.

El 24 de septiembre la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo el honor de celebrar la Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Ilma. Sra. Dña. Margarita del Val Latorre, Investigadora Científica del CSIC en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), quien impartió la conferencia titulada "Infecciones Virales, respuesta inmunitaria y vacunación". Fue presentada por el Presidente de la RANF, Académico de Número el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

Dña. Margarita del Val se doctoró en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid bajo la supervisión del Prof. Dr. Eladio Viñuela. Durante su estancia postdoctoral en Tübingen y en Ulm (Alemania), inició estudios sobre la respuesta inmune celular frente a las infecciones virales, la interferencia de los virus con esta respuesta inmune, y el procesamiento y presentación de antígenos virales a linfocitos T citotóxicos, que le llevó al diseño de la primera vacuna experimental basada en epítomos T aislados, concepto que es actualmente la base de varios ensayos clínicos. Tras establecer su propio grupo en el Instituto de Salud Carlos III en Madrid, actualmente es Investigadora Científica del CSIC en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) en Madrid. En los últimos años, su investigación se ha orientado hacia el estudio de la respuesta inmune frente a patógenos en modelos animales de infección y vacunación. Ha dirigido numerosos proyectos de investigación, ha publicado artículos de gran impacto, realiza divulgación científica y ha sido representante de España y experta asesora en la Agencia Europea del Medicamento.

El tema de su conferencia versó sobre "Infecciones virales, respuesta inmunitaria y vacunación". Las vacunas contribuyen a mejorar las condiciones sanitarias de la sociedad y a extender la esperanza de vida. Todavía el 25% de muertes en el mundo está causado por infecciones. La mayoría de las vacunas actuales están basadas en inducir buenos anticuerpos. Sin embargo, hay infecciones crónicas de alto impacto sanitario, que son refractarias a las estrategias tradicionales de diseño de vacunas, y cuya eliminación requiere una potente respuesta inmunitaria celular. El objetivo de nuestro trabajo es aprender a mejorar la eficacia, la eficiencia, y la duración de la respuesta inmunitaria celular necesaria para diseñar nuevas vacunas. Así, estudiamos las "vías de procesamiento proteolítico y presentación de antígenos de virus"; son estas las vías moleculares y celulares que, a partir de las proteínas virales, generan pequeños péptidos virales y además los muestran en la superficie celular, dando así una señal de alarma rápida y específica para la detección de estas células infectadas por los linfocitos T que patrullan el organismo, y que a continuación las eliminan. Además, estudiamos los factores implicados en la diferenciación de estos linfocitos T citolíticos a "linfocitos de memoria", que permiten que la inmunidad conferida por las vacunas sea de larga duración.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos durante este último trimestre hay que destacar que, nuestro Académico de Número, Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez ha sido elegido por la Fundación BBVA para la concesión de una de las cinco ayudas a equipos de investigación. El proyecto de investigación en el área Cardiovascular cuyo investigador principal es el Dr. Tamargo ha sido elegido de entre 324 proyectos presentados a la comisión evaluadora.

Las Ayudas Fundación BBVA a Equipos de Investigación Científica en Biomedicina responden al compromiso de la Fundación BBVA con el impulso la ciencia de excelencia y a su interés por impulsar acciones que redunden en beneficio de la sociedad en su conjunto, como ocurre con la mejora del saber en el ámbito de la salud. Las Ayudas están dirigidas a investigadores o grupos de investigación de universidades públicas o privadas y de otras instituciones públicas o privadas no lucrativas con actividad investigadora significativa y que presenten proyectos de investigación altamente innovadores de naturaleza básica, traslacional o aplicada.

Los cinco equipos receptores de las ayudas han sido los más valorados entre 324 candidaturas del más alto nivel

presentadas a la convocatoria. La valoración de las candidaturas se lleva a cabo por tres comisiones de evaluación compuestas por destacados expertos en cada una de las áreas: oncología, cardiología y enfermedades neurodegenerativas. Una comisión evaluadora general final ratifica el resultado de las anteriores.

Asimismo, a nuestro Académico Correspondiente, Prof. Dr. D. Daniel de la Cruz Sánchez Mata le ha sido concedida la Medalla de Honor de la Universidad Complutense de Madrid, que le fue impuesta por el Rector, Prof. Carlos Andradás Heranz, el viernes 25 de septiembre, durante el solemne acto académico de la apertura del presente curso 2015-2016.

Por último, con motivo de la jubilación de la Profesora M^o del Carmen de la Rosa, Académica Correspondiente de la RANF el Departamento de Microbiología II ha organizado un acto homenaje en reconocimiento a su labor docente e investigadora durante 50 años que se celebró el pasado 18 de septiembre en el Salón de Actos COFARES del aulario nuevo de la Facultad de Farmacia.

En el capítulo de obituarios, tenemos que lamentar el fallecimiento de nuestro Académico de Número, el Excmo. Sr. D. N. Víctor Jiménez Torres, Doctor en Farmacia, Catedrático de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia (desde 1974). Fue un farmacéutico referente que ocupó la presidencia de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria de 1985 a 1988.

El Doctor Jiménez Torres se ha destacado por su significativa y valiosa contribución al desarrollo hospitalario de la atención que los Servicios de Farmacia prestan a los pacientes, así como por su actitud innovadora en la Farmacia Hospitalaria, especialmente en el campo de la farmacocinética clínica y su aplicación en la individualización de dosis de medicamentos antibióticos, inmunosupresores y antineoplásicos. Además en el año 2006 fue nombrado Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, por haberse distinguido en la investigación y el estudio de las ciencias farmacéuticas y sus afines. Con este nombramiento, el Doctor Jiménez Torres pasó a ocupar la Medalla número 35 de esta importante Institución que tiene su origen en 1737 y que pretende fomentar la investigación y el estudio de las Ciencias Farmacéuticas. Ha publicado 11 libros, más de 260 trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales, en colaboración interdisciplinar sobre distintas líneas de investigación y ha dirigido más de 40 tesis.

Por otra parte, le otorgaron el Premio "achievement award ISOPP 2004" de la International Society Oncology Pharmacy Practice por su significativa contribución al desarrollo de la atención que los Servicios de Farmacia prestan en el ámbito de la oncología y en el 2004 fue seleccionado por la revista "European Journal Hospital Pharmacy" entre los diez farmacéuticos científicos de Europa con más aportaciones realizadas al ámbito de la Farmacia Hospitalaria.



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA