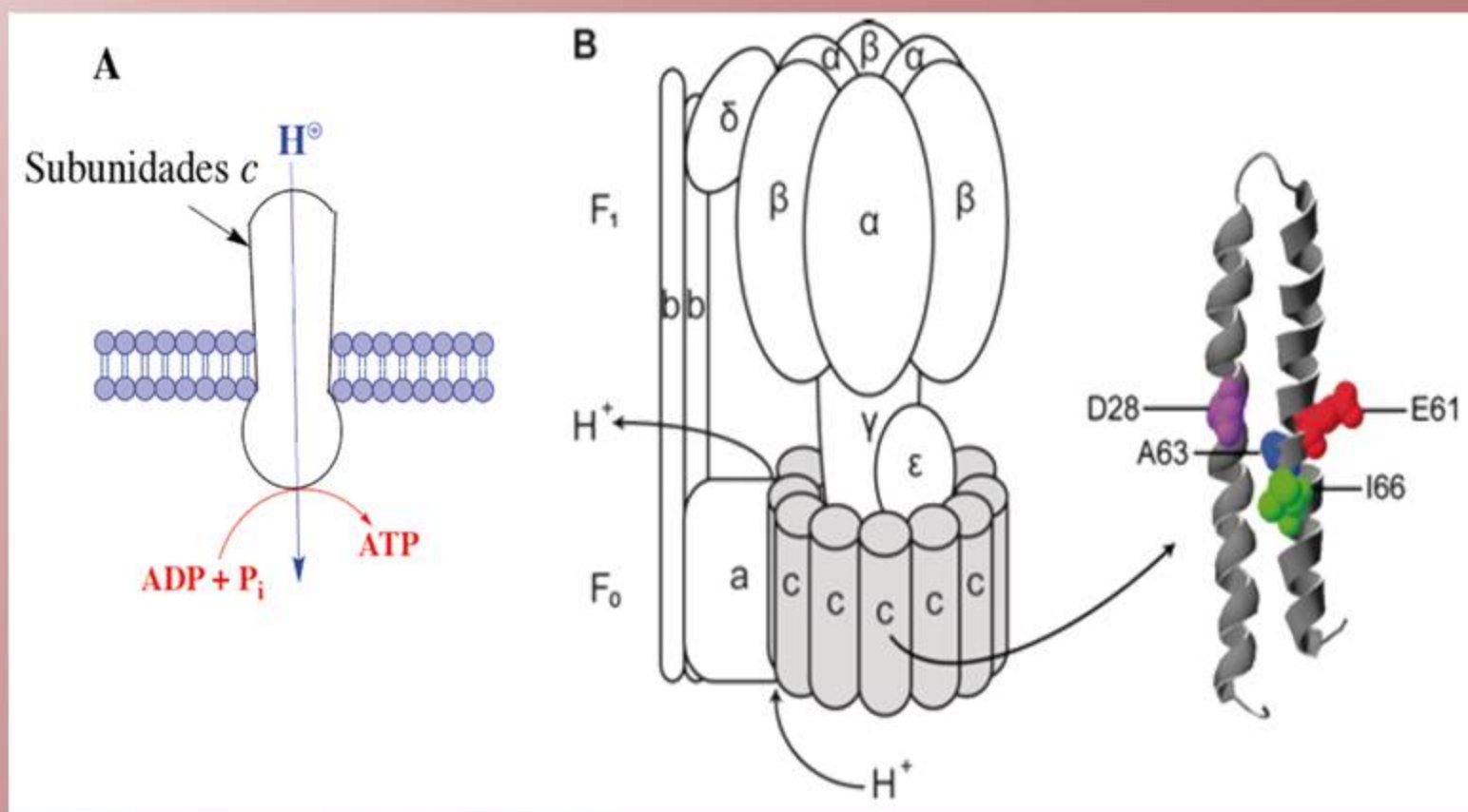


ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 81 | Número 4 | Octubre – Diciembre 2015



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



Commitment with society in our DNA

Title in Spanish: *El compromiso con la sociedad en nuestro ADN*

Antoni Esteve Cruella¹

¹Presidente de FarmaIndustria

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 293-296

Received: November 21, 2015 **Accepted:** December 14, 2015

Language of Manuscript: Spanish

Querido presidente, querido Antonio, estimados Académicos, apreciados todos.

Muy buenas tardes y muchas gracias por acompañarme hoy aquí, en esta magnífica Real Academia, para compartir esta reflexión sobre la responsabilidad y el compromiso social de la industria farmacéutica, tanto de las compañías, como de la asociación patronal Farmaindustria, que me honro en presidir.

El ácido desoxirribonucleico, el popular ADN, es una molécula que, como todos aquí bien sabéis, forma parte de las células y contiene la información genética responsable del desarrollo y funcionamiento de los organismos. Es el código que determina qué somos y cómo nos comportamos. Todos los seres vivos, sin excepción, respondemos a la información que contiene nuestro ADN.

Por extensión, en la sociedad contemporánea, hemos empezado también a aplicar este concepto genético a las organizaciones humanas y, así, hablamos del ADN de un colectivo, de una empresa o de un territorio, por ejemplo, para referirnos a los valores que los inspiran o las características que los definen.

Nuestro sector, la industria farmacéutica, tiene igualmente una identidad definida, un ADN caracterizado por su apuesta por la innovación y el conocimiento, y por la búsqueda de soluciones a enfermedades y problemas de salud no resueltos; y es precisamente este perfil lo que nos otorga una responsabilidad sobreañadida y, en muchas ocasiones, hasta desconocida, y que hoy me gustará recordar.

En ese núcleo de lo que somos, tiene también un lugar destacado el compromiso empresarial con la sociedad en la que nuestras compañías desarrollan su actividad y con la que se relacionan, un compromiso que modula nuestra tarea diaria y nos hace más honestos, más sensibles, más eficaces y, por tanto, mejores.

Hay que decir bien alto que la industria farmacéutica innovadora está comprometida con la salud y con el bienestar de los ciudadanos, con la calidad del sistema sanitario, su estabilidad y sostenibilidad, pero también con el desarrollo industrial, innovador y exportador, en definitiva, en hacer del nuestro un país más rico y competitivo económica y socialmente hablando.

Y todo ello, no lo olvidemos, sobre la base de

investigar y desarrollar nuevos medicamentos que puedan aportar soluciones para la salud de los pacientes, bien en términos de curación de una enfermedad, bien en ganancia de calidad de vida, o bien en ahorro de sufrimientos para la persona afectada y sus familiares.

¿Hay mayor compromiso social que ese, que esa apuesta por proteger el bien más apreciado del que disfrutamos los seres humanos, que es la vida? En mi opinión, la respuesta es claramente no. La actividad de la industria farmacéutica no podría ser más satisfactoria: posibilitar a los pacientes fármacos innovadores que puedan curar sus enfermedades o, en su defecto, mejorar sus condiciones de vida.

Y desde luego, y en contra de alguno de estos mitos sobre nuestra actividad que tanto proliferan, no nos limitamos a investigar y desarrollar nuevos productos sólo en aquellas patologías más prevalentes en las sociedades occidentales y que, por tanto, más enfermos podrían utilizar y, consecuentemente, mayor beneficio podrían reportar a nuestras empresas.

Bien al contrario, en las últimas décadas esta industria ha redoblado sus esfuerzos en la búsqueda de alternativas terapéuticas para las enfermedades raras, las menos frecuentes, las que afectan a menos de una de cada 2.000 personas. Este tipo de dolencias son ya el grupo terapéutico con mayor número de proyectos de I+D en nuestras compañías, con más de 1400 fármacos en desarrollo, sólo en Europa, en la actualidad.

Tampoco nos centramos tan solo en solucionar los problemas del primer mundo, los de aquellas sociedades económicamente potentes y con capacidad para sufragar elevados gastos sanitarios. Una de cada siete personas en el mundo sufre alguna enfermedad de las denominadas desatendidas, y la inmensa mayoría de ellas vive en países en vías de desarrollo.

La industria farmacéutica innovadora lleva miles de millones de euros invertidos en este ámbito, con actualmente más de 150 proyectos en desarrollo para lograr nuevos medicamentos y vacunas, el 86% de los cuales son proyectos compartidos con el sector público, organismos internacionales u ONGs.

De hecho, nuestra federación internacional, la IFPMA, promueve activamente partenariados con instituciones

públicas, como la OMS, para garantizar el esfuerzo continuado en esta labor, aún reconociendo –seamos modestos– el largo camino que nos queda por recorrer.

En los países desarrollados, como es el caso de Europa, la expectativa de vida ha crecido considerablemente en los últimos 65 años, y continúa creciendo, siendo precisamente España el país con mejores índices de longevidad, ya por encima de los 80 años, tanto en hombres como en mujeres. Si nos preguntamos qué papel han tenido los nuevos medicamentos en la mejora de esa mayor longevidad de los ciudadanos, más allá del diagnóstico precoz y hábitos de vida –ganando la batalla en patologías como el cáncer, por ejemplo–, debemos convenir que los fármacos hoy disponibles han contribuido muy notablemente a ese progreso, aumentando tanto la esperanza como la calidad de vida.

Y ello es igualmente aplicable a otras enfermedades que hoy todavía tienen un mal pronóstico, precisamente por no disponer de medicamentos eficaces y seguros, pues se estima que existen 16.000 proyectos en curso, de los que el 80% están dirigidos a enfermedades hoy sin tratamiento, como son algunas enfermedades neurológicas degenerativas, cáncer, enfermedades infecciosas o bien inmunológicas, sin olvidar aquellas de origen genético, en las que las ciencias ómicas tanto están ya aportando y suponen un nuevo paradigma en la farmacología contemporánea.

Repito, la industria farmacéutica tiene grabado a fuego en su ADN la apuesta por la innovación, por la búsqueda de lo desconocido, por la generación de nuevos hallazgos y conocimientos, en definitiva, por el progreso. Nuestras plantas de producción y centros de I+D son auténticas fábricas del saber, el conocimiento es nuestra habilidad competitiva.

Pero para alcanzar niveles de conocimiento competitivos, tal como están avanzando las ciencias biomédicas, es absolutamente necesario abrirnos y traer colaboraciones, acceder inteligentemente a focos de sabiduría, complementar nuestras propias habilidades con las de otros especialistas, buscar continuamente la excelencia en aquellas ciencias que no están, ni estarán ya jamás, a nuestro alcance, pues el desarrollar un fármaco innovador con mínimas garantías de éxito, exige, sobretudo, de esa excelencia durante el complejo y, cada vez más multidisciplinar, proceso de desarrollo y creación de un compendio científico exigido por las autoridades regulatorias sanitarias de todo el mundo para validar la innovación farmacológica; y, evidentemente, esa excelencia no es alcanzable por una sola institución, por potente que esta sea.

Esa vocación por la investigación es costosa, ardua y prolongada. Somos el sector industrial más intensivo en investigación, por delante de cualquier otro, tanto en términos relativos, respecto a su cifra de negocio, como en términos absolutos, por delante de sectores tan importantes como el de la automoción.

Me gustaría, en este sentido, hablar de España, y resaltar que de la inversión en I+D de nuestras compañías

–casi 1.000 millones de euros en 2014–, cerca de 400 millones (un 40% del total) se destinaron a proyectos colaborativos con hospitales, universidades y otros centros de excelencia, lo que denominamos I+D extramuros, una investigación más colaborativa, más abierta y, por tanto, más competitiva. En España disponemos de un sistema sanitario de alto nivel, con excelencias profesionales y equipos, probablemente de los mejores de Europa, que debemos seguir promoviendo, y ello exige un flujo constante de innovación, conocimiento, para continuar ganando en eficiencia y calidad.

Nuestro sector representa un verdadero pilar de ese modelo, promovemos la innovación abierta, generamos corrientes positivas de conocimiento hacia nuestro sistema, implicamos a profesionales e instituciones y, posteriormente, promovemos su internacionalización mediante la participación activa en proyectos multinacionales, creando un ciclo virtuoso, favoreciendo la creación de ecosistemas atractivos para la innovación y de los que todos nos beneficiamos, y muy especialmente los pacientes. Hoy, como había sido habitual en el pasado, ya no es necesario, ni recomendable, ir al extranjero para un segundo diagnóstico o tratamiento, lo mejor está aquí, en España, y nos sentimos absolutamente orgullosos de ayudar desde nuestro sector a hacerlo posible.

Buen ejemplo de esa vinculación entre sectores son nuestras aportaciones al Instituto de Salud Carlos III, cerca del 2% de las ventas del sector en oficina de farmacia es destinado a financiar la investigación pública, favorecer el uso racional del medicamento, la cohesión sanitaria entre comunidades y la formación de los profesionales; o el proyecto BEST de excelencia en investigación clínica de medicamentos en España, impulsado desde hace una década por FARMAINDUSTRIA. Año a año, BEST fomenta la participación de nuestro país en proyectos de investigación clínica, y ya se han involucrado en él 45 compañías farmacéuticas, 50 hospitales, 13 comunidades autónomas y tres grupos de investigación clínica independiente.

Precisamente, el sector industrial farmacéutico necesita imprescindiblemente de un entorno favorable para desempeñar su actividad, que pueda acometer su reto emprendedor con acceso ágil a un entorno innovador, caracterizado por su cultura favorable al riesgo, por su gente y talento, así como por su voluntad y compromiso social. Y es que, más allá del conocimiento necesario para desarrollar un fármaco seguro, efectivo y de alto valor clínico se requieren, de media, siete millones de horas de trabajo, el desempeño de 4.000 personas en un año con una jornada laboral normal. En total, un laboratorio tarda de media entre 12 y 13 años en desarrollar y llevar al paciente un nuevo medicamento o vacuna. Y con un considerable riesgo operativo, puesto que solo 3 de cada 10 medicamentos comercializados generan ingresos globales que superan los costes medios de I+D. Pero todos esos esfuerzos merecen la pena si finalmente se consigue una molécula que aporta soluciones y genera mejoras sustanciales en la salud de los enfermos, con la lógica

favorable repercusión económica que debe representar para el impulsor del proyecto, al menos, lo suficiente para incentivar la continuidad de ese espíritu innovador. ¡El riesgo asumido debe merecer la pena!

Esas soluciones y mejoras se traducen en cifras incontestables, los medicamentos innovadores comercializados entre 2004 y 2009 fueron los responsables del 73% del aumento de esperanza de vida de 1,74 años, registrado en este periodo a nivel global.

En concreto, como ejemplo, la cifra de nuevos tratamientos disponibles contra el cáncer pasó de 15 a 129. En el mismo periodo, los supervivientes al cáncer solo en Estados Unidos crecieron de 4,57 a 11,7 millones de personas.

Otro caso llamativo es el del VIH. La aportación de las terapias antirretrovirales a mediados de los 90 redujo la mortalidad por SIDA un 90%. O los nuevos tratamientos contra la Hepatitis C, que están prácticamente erradicando la enfermedad con tasas de curación próximas al 1000%.

Y todo esto es posible también gracias al personal enormemente cualificado con el que contamos. Somos fuente de empleo de calidad y de empleo estable. Poniendo especial interés en este ámbito mediante la incorporación a nuestros equipos laborales del talento más joven y preparado, el que tienen los recién salidos de su formación universitaria, pero que son los llamados a protagonizar los hallazgos e innovaciones más importantes en el ámbito de las ciencias de la salud en las próximas décadas. Debemos revertir la tendencia de ver salir al exterior a los jóvenes más talentosos por falta de oportunidades en su entorno más próximo, y debemos conseguir que, si lo hacen, vuelvan con sus experiencias adquiridas y las reviertan en conocimiento.

La industria farmacéutica española da empleo directo a alrededor de 40.000 personas y genera otros 160.000 puestos de trabajo más, entre indirectos e inducidos. Además, nuestro personal presenta la mayor proporción de toda la industria española de dedicación a actividades de I+D. Alrededor del 12% de nuestros trabajadores se dedican a estas tareas.

También es una buena muestra de nuestro decidido compromiso con la sociedad la actividad que las distintas compañías farmacéuticas desarrollan en el ámbito de la formación, tanto interna –entre sus propios colaboradores– como externa –dirigida a profesionales sanitarios o representantes de pacientes.

Con respecto a los profesionales sanitarios, la industria farmacéutica ha asumido la responsabilidad de facilitar y participar en la formación continuada de médicos, farmacéuticos, enfermeros y demás trabajadores sanitarios del Sistema Nacional de Salud. En este ámbito, las compañías organizan y colaboran en la celebración de congresos científicos y otros eventos formativos para estos colectivos que permitan a nuestros profesionales sanitarios estar a la vanguardia de la Ciencia en el mundo.

Creemos en las alianzas y en el esfuerzo compartido para mejorar la salud de los ciudadanos y con ese objetivo

trabajamos codo con codo también con los farmacéuticos y otros agentes sanitarios. En esta línea, estamos poniendo en marcha un ambicioso proyecto para contribuir a mejorar la adherencia a los tratamientos y hacer así frente a un importante problema para nuestro sistema sanitario. Somos conscientes del riesgo en salud e ineficiencia económica que supone una deficiente cumplimentación terapéutica, pues asumiendo el grado de responsabilidad que nos corresponde, debemos aunar esfuerzos para atajar el problema y convertirlo en una verdadera oportunidad, poniendo al medicamento donde se merece, un activo de valor incalculable, que vela por la salud y que resulta disponible gracias al esfuerzo de todos.

Debemos trabajar para que la sociedad comprenda el valor que tiene un tratamiento y la enorme importancia de cumplirlo de forma completa para lograr, por un lado, los objetivos terapéuticos potenciales que tiene el medicamento y, por otro, asegurar el mejor uso de los recursos sanitarios y, en definitiva, contribuir a mejorar la eficacia y eficiencia de nuestro sistema. Es una magnífica oportunidad para que farmacéuticos de oficina de farmacia e industria trabajemos conjuntamente para poner en valor la contribución del medicamento mediante la promoción de su uso responsable.

Y todas estas relaciones que mantenemos con otros colectivos del entorno sociosanitario (pacientes, profesionales, instituciones) debemos desarrollarlas de acuerdo a los más elevados estándares de ética y transparencia. Por eso, desde 2002, la industria farmacéutica innovadora española se rige por un sistema de autorregulación, reflejado en nuestro Código de Buenas Prácticas, que desde el año pasado tiene una nueva versión que hace especial hincapié en transparentar las relaciones de los laboratorios con profesionales y organizaciones sanitarias.

Es una prueba de la mejora continua del sector con los mayores niveles de exigencia ética y de responsabilidad para reforzar más la confianza de la sociedad en el sector sanitario. Esta iniciativa, que probablemente no tenga precedentes en ningún otro ámbito industrial, demuestra que este sector se adecúa a los tiempos y exigencias actuales, y corrobora que se trata de uno de los más comprometidos con su entornos y actividad.

No quisiera tampoco dejar de resaltar que nuestro compromiso y responsabilidad con la sociedad española se ha hecho notar especialmente en los últimos años en el ámbito de nuestra aportación a la sostenibilidad del sistema sanitario público.

Todo el sector farmacéutico, no solo la industria, también las farmacias, ha dado muestras sobradas de su lealtad hacia las Administraciones Públicas, soportando, en los años más duros de la terrible crisis económica que hemos vivido, un tercio de toda la reducción del gasto sanitario público ocurrida entre 2009 y 2013. La factura farmacéutica en oficina de farmacia se ha reducido un 26,4% (3.400 millones de euros al año) desde mayo de 2010, situando el gasto per cápita a niveles de 2003 y por debajo de la media europea en diversos indicadores. Los

trastornos ocasionados por este terremoto serán difíciles de digerir, hemos perdido talento, hemos reducido el gasto en I+D, tanto interno como externo, hemos cerrado instalaciones, las compañías nacionales han perdido fuelle expansivo; en definitiva, hoy somos menos competitivos, pero, a pesar de ello, ni mucho menos perdemos la fe y, más aún, no dejamos de promover optimismo, y creemos en nuestras fortalezas para continuar respondiendo a nuestra misión y también cumplir con aquello que la sociedad espera de nosotros, que no es otra cosa que aportar nuevas oportunidades terapéuticas y soluciones para que estas oportunidades lleguen a los pacientes.

Porque se avecina una época de gran progreso en la terapia medicamentosa; las nuevas tecnologías biomédicas van a incrementar el actual arsenal terapéutico con innovaciones radicales que van a proporcionar un salto muy relevante en materia de salud. La industria se siente comprometida con la sostenibilidad financiera de los sistemas de salud y está trabajando responsablemente buscando soluciones para que el acceso de los ciudadanos a estos tratamientos sea el adecuado.

En estas circunstancias, nuestro sector ha apostado decididamente por favorecer la evolución del sistema sanitario público hacia un modelo imaginativo y vanguardista en el que, poniendo todos de nuestra parte, seamos capaces de responder satisfactoriamente a los grandes retos que se avecinan. La sostenibilidad del modelo actual de atención sanitaria está seriamente en cuestión, por su escasa financiación, compleja estructuración, débil retribución, escasa incentivación y muchas ineficiencias; sin embargo, y tal y como ya he apuntado, milagrosamente nuestro sistema sanitario hoy sigue siendo de un gran nivel, pues gozamos de grandes activos para, repito, ser optimistas.

Llevamos ya un tiempo trabajando con el Gobierno, en la elaboración de un marco de estabilidad que permita responder a los grandes retos en materia de atención farmacéutica, su calidad y acceso, su racionalización y financiación, mediante la plasmación de un Protocolo de Entendimiento, basado en identificar aquellos elementos clave de recuperación para nuestro sector empresarial en materia de innovación, empleo, industrialización y exportación, para ser valorados y promovidos, de tal manera que sean respetuosos y, por tanto, concilien con las expectativas presupuestarias.

Estos meses de trabajo conjunto nos demuestran y confirman la oportunidad única del rol tractor que nuestro sector puede y debe aportar al país para su pronta recuperación y, más aún, de su capacidad para acercarnos a un modelo más competitivo de la industria del conocimiento, nuestro gran reto social para este siglo XXI.

Me gustaría pensar que cada vez son más los que ven a la industria farmacéutica innovadora como un sector valiente formado por miles de hombres y mujeres para los que el futuro no es una quimera inalcanzable ni les genera miedo a lo desconocido, sino que constituye una evidente oportunidad de mejora y crecimiento. Esa valentía, esa apuesta por el futuro, está implícita en nuestra actividad

natural, la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, terapias aún no conocidas, quizás ni siquiera imaginadas, que están llamadas a curar enfermedades que hoy no tienen solución, y a mejorar la calidad y la duración de la vida de millones de personas contribuyendo así a la construcción de una sociedad más sana, más avanzada y más equitativa.

Con ese espíritu pionero, innovador y atrevido afrontamos el futuro más cercano, con ganas de crecer, de aportar y de ofrecer soluciones a la sociedad española tanto en el ámbito de la salud como en términos de generación de riqueza, porque estamos convencidos de que todavía tenemos mucho que ofrecer. Es un compromiso social que no podemos eludir ni ignorar. Está en nuestro ADN. Muchas gracias.



Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties

Title in Spanish: *Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas*

J. González-Albadalejo¹, Dionisia Sanz¹, Rosa M. Claramunt^{1*}, José Luis Lavandera², Ibon Alkorta³, José Elguero^{3,4}

¹Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica, Facultad de Ciencias, UNED, Senda del Rey, 9, E-28040 Madrid.

²Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA), Facultad de Medicina, Universidad CEU San Pablo, Campus de Montepríncipe, Boadilla, E-28668 Madrid. ³Instituto de Química Médica, Centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006-Madrid. ⁴Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

ABSTRACT: This review concerns curcumin, a fascinating molecule that has a wide use in medicine for diseases as significant as cancer and Alzheimer. The chemical and physicochemical properties of curcumin and some of its derivatives (curcuminoids and hemicurcuminoids) will be described, in particular curcuminoids bearing a heterocycle. The most relevant biological and pharmacological properties will also be reported. At the end, our contribution to this subject is briefly presented.

RESUMEN: Esta revisión versa sobre la curcumina, una molécula fascinante, cuyas propiedades medicinales cubren campos como cáncer y Alzheimer. Se describen sus propiedades químicas y físicoquímicas así como las de algunos de sus derivados (los curcuminoides y hemicurcuminoides), en particular aquellos que contienen un heterociclo. Las propiedades biológicas y farmacológicas más relevantes serán también mencionadas. Para concluir, se presenta brevemente nuestra contribución a este campo.

*Corresponding Author: rclaramunt.ccia@uned.es

Received: November 21, 2015 Accepted: December 14, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 4 (2015), pp. 278-310

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

El interés por la curcumina no deja de crecer como lo atestiguan las numerosas revisiones bibliográficas (1-11) [en un número reciente de esta revista hay un artículo sobre ella (12)]. Una búsqueda en Google arroja 1.240.000 resultados (pero muchos son de productos comerciales y de medicina natural) y otra en la base de datos ScienceDirect resulta en 11.750 artículos (para "curcuminoids" aparecen 1.422 citas). Es evidente que la presente revisión sólo puede dar una visión parcial de la curcumina y de sus derivados.

1.1. Taxonomía y origen

La curcumina (**1**) (Figura 1) pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos presentes en los rizomas o tallos subterráneos de la planta tropical

Cúrcuma (*Curcuma longa* L, Zingiberaceae), conocida también como turmérico o haldi, nativa del sur y sudeste del Asia tropical que pertenece a la familia del jengibre.

La cúrcuma es utilizada en el Sudeste Asiático y en la India desde hace miles de años. Sus múltiples aplicaciones incluyen dar sabor a los alimentos, teñir telas de color amarillo-naranja y como remedio para aliviar diferentes trastornos de la salud. La planta es de tallo largo (cerca de un metro de longitud) y sus flores son de color blanco. El rizoma de la planta, donde se encuentran los pigmentos curcuminoides, tiene unas dimensiones máximas de unos 7 cm de largo por 2,5 cm de ancho. La planta necesita aproximadamente 8-10 meses para madurar.



Figura 1. Curcumina recrystalizada en etanol-agua (fotografía UNED).

Ha sido y sigue siendo una parte importante de la cultura en la India y se utiliza incluso como parte de ritos religiosos. La medicina ayurvédica o medicina tradicional hindú utiliza la cúrcuma en las depuraciones, como ayuda digestiva, fiebres, infecciones, disentería, artritis y problemas hepáticos. Los médicos chinos recomiendan la cúrcuma en casos de hemorragia, trastornos hepáticos, problemas menstruales y congestión. Los antiguos griegos también utilizaban la cúrcuma por sus beneficios para la salud. Su composición se indica en Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la cúrcuma.

Composición	Porcentaje (%)*
Curcuminoides	2.5
Fibra	3.5
Aceites	4.6
Minerales	3.2
Proteínas	5.8
Grasas	4.7
Agua	12.0
Hidratos de carbono	63.7

*Este porcentaje varía dependiendo de la región de origen.

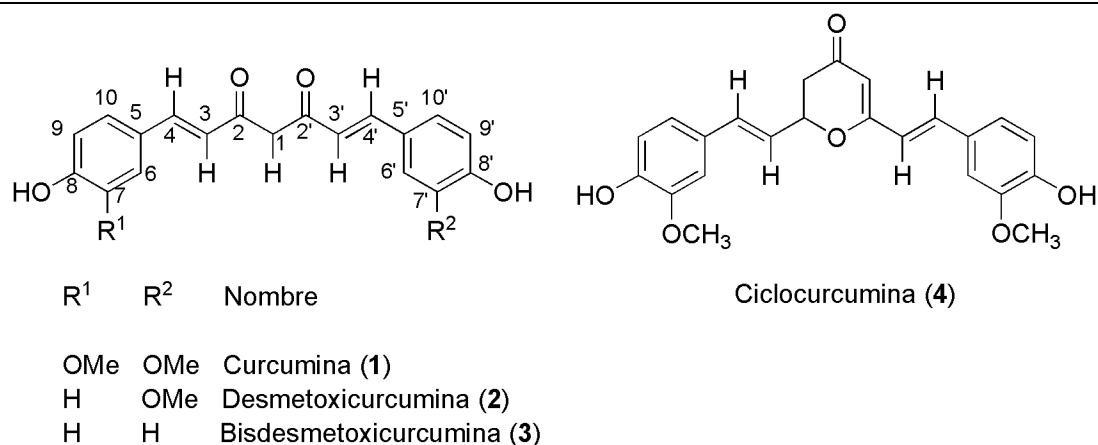
1.2. Objetivos

Esta revisión tiene como objetivo el conocimiento de la estructura y propiedades de una molécula con un gran potencial biomédico, que puede jugar un papel importante en varias enfermedades tales como cáncer, inflamación y Alzheimer, así como de sus derivados naturales o sintéticos.

2. QUIMICA ESTRUCTURAL

2.1. Análisis estructural

La curcumina (**1**, $C_{21}H_{20}O_6$), aislada por primera vez en 1815, es el principal polifenol curcuminóide encontrado en la cúrcuma y el principal responsable de las propiedades medicinales y farmacológicas de la misma. Está presente junto con la desmetoxicurcumina (curcumina II, **2**), la bisdesmetoxicurcumina (curcumina III, **3**) y la más recientemente descubierta ciclocurcumina (curcumina IV, **4**) (Figura 2). Juntas forman el complejo conocido como azafrán indio o amarillo natural 3 y son responsables del color que presenta. También han sido descritos otros productos naturales tales como las terpecurcuminas (curcuminoides conjugados con terpenos) (13). Algunos curcuminoides naturales y sintéticos han sido ensayados como neuroprotectores (14).

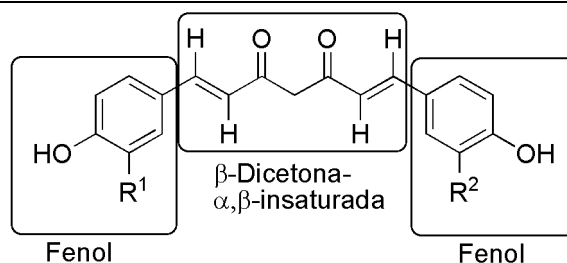
**Figura 2. Componentes de la cúrcuma.**

La curcumina, 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (1), al igual que los curcuminoides, presenta un esqueleto hidroxicarbonado dicetónico con varios grupos funcionales, diferentes según el derivado curcuminoides, dotando a la molécula de un comportamiento químico característico, sensible tanto al entorno químico adyacente, como a la propia reactividad de dichos grupos funcionales resultando en las propiedades medicinales y farmacológicas antes indicadas.

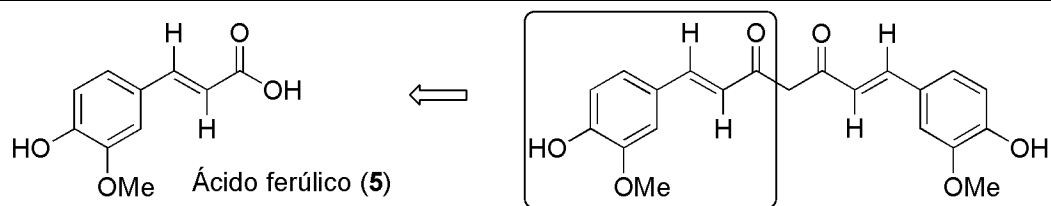
Estructuralmente se clasifica dentro de la familia de los diarilheptanoides, productos naturales cuyas estructuras poseen dos restos arilo, hidroxi u oxo sustituidos unidos entre sí a través de una cadena carbonada de 7 átomos que posee una función 1,3-dicarbónica y diversas insaturaciones.

Como se puede observar en la Figura 3, el esqueleto hidroxicarbonado dicetónico al que se ha hecho referencia es una estructura simétrica sin centros estereogénicos, cuyo esqueleto está formado por dos anillos fenólicos conectados entre sí por un puente dicetónico α,β -insaturado de 7 carbonos con el grupo hidroxilo en *para*

respecto al puente.

**Figura 3. Estructura de la curcumina.**

En concreto, podemos identificar dos residuos de ácido ferúlico (5) unidos entre sí por un puente metilénico (Figura 4). Por esa razón, ciertos autores usan el nombre diferuloilmetano para la curcumina.

**Figura 4. Relación entre la curcumina y el ácido ferúlico.**

Hay una familia de compuestos relacionados con la curcumina y representados en la Figura 5, que no serán tratados aquí porque no son β -dicetonas (por eso se llaman análogos monocarbónicos) (15-18).

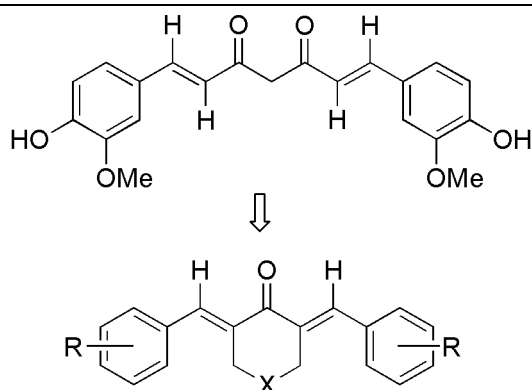


Figura 5. Análogos monocarbonílicos de la curcumina.

La curcumina es una molécula anfipática (molécula con grupos hidrófilos e hidrófobos, lo que la capacita para

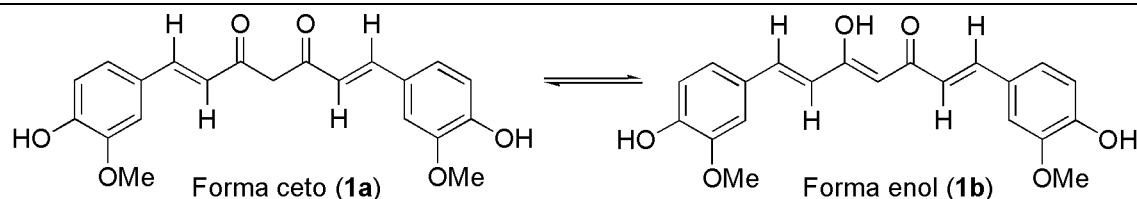


Figura 6. Los dos tautómeros de la curcumina.

En la curcumina, el cetoenol **1b** es el tautómero predominante, tanto en disoluciones acuosas como en disolventes orgánicos, y en especial en disolventes próticos polares (por ejemplo, alcoholes) y en disolventes apróticos polares (por ejemplo, dimetilsulfóxido). En disolventes apolares la forma enol sigue siendo mayoritaria, pero el equilibrio ya no está tan desplazado hacia este tautómero y no existe una forma predominante clara.

En 2014, Antonov, L. *et al.* llevaron a cabo un detallado estudio experimental y teórico del efecto del agua sobre la tautomería ceto-enólica de la curcumina (20). Estos autores concluyen que en una mezcla 90% de agua - 10% de etanol, la forma dicetónica (**1a**) predomina.

En entornos no polares la curcumina existe como un tautómero *cis*-enol de conformación cerrada con un enlace de hidrógeno intramolecular (IMHB, intramolecular hydrogen bond), mientras que en disolventes polares adopta una conformación abierta con un enlace de hidrógeno intermolecular (Figura 7).

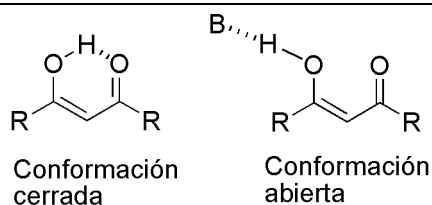


Figura 7. Formas cerrada y abierta del enol; B es un disolvente aceptor de enlaces de hidrógeno.

Veamos a continuación una serie de propiedades de la molécula que hacen que tenga un comportamiento

ser parcialmente soluble en agua y en disolventes orgánicos), mostrando polaridad en la parte central de la molécula (puente dicetónico α,β -insaturado); aunque en la bibliografía suele referirse a ella como lipófila, se ha demostrado que la solubilidad de la curcumina en heptano es más baja que en ácido heptanoico debido a su polaridad.

Otra característica estructural importante es la tautomería ceto-enólica presente en la curcumina y los curcuminoides en general (Figura 6). Hay que notar que hay dos formas enol **1b** idénticas, dependiendo del carbonilo que se enoliza, fenómeno común con la acetilacetona (pentano-2,4-diona) y con el dibenzoilmetano (1,3-difenilpropano-1,3-diona) (19).

característico y unas determinadas interacciones con el entorno.

a) *La estructura dicetónica α,β -insaturada puede comportarse como dadora o aceptora de enlaces de hidrógeno*

Esta propiedad deriva directamente de la última característica estructural señalada anteriormente, es decir, de la conformación abierta o cerrada que adquiere la estructura dependiendo de la polaridad del medio.

En un entorno polar como el medio fisiológico, encontraremos la curcumina en su forma abierta, pudiendo interactuar con moléculas de agua o grupos polares proteicos. En cambio en la forma cerrada el H enólico forma parte de una interacción intramolecular.

b) *Capacidad dadora y aceptora de los grupos OH del anillo fenólico*

A medida que el puente ceto-enol satura su actividad dadora o aceptora de enlaces de hidrógeno, adquieren importancia los grupos OH de los anillos fenólicos.

c) *Capacidad aceptora de los grupos metoxi*

Entra en juego el tercer grupo funcional importante en la molécula, OMe, que en este caso sólo es aceptor de enlaces de hidrógeno.

d) *Alto nivel de coordinación con metales multivalentes y cationes no metálicos*

Esto es debido a la estructura de ceto-enol de la β -dicetona en su forma aniónica (21,22). Algunos autores piensan que la capacidad complejante también se debe, o se acentúa, gracias a la presencia de los oxígenos de los anillos fenólicos. Esta propiedad hace que la curcumina adquiera especial importancia frente a metaloproteínas pudiendo interactuar con el cofactor metálico de la

metaloproteína e inhibir la acción de esta.

Varios trabajos describen complejos de metales con la curcumina o con curcuminoides: Cu(II) (23,24), Zn(II) (25), incluido un marco metalo-orgánico (MOF, metal-organic frameworks) usando Zn(II) (26). Una revisión reciente describe los complejos metálicos de la curcumina y sus aplicaciones en el campo del cáncer debidas a su mejorada estabilidad (27).

e) Alto coeficiente de reparto (log K)

La curcumina es poco soluble en agua, su coeficiente de reparto en octanol/agua es de 3,3 aproximadamente, por lo que a pesar de la polaridad de la parte central de la molécula y los grupos adyacentes, la molécula es más lipófila, aunque como se ha mencionado antes no en su totalidad. Esta propiedad genera comportamientos específicos, así la curcumina puede interactuar con aminoácidos hidrófobos en los centros activos de la

proteína.

Otro comportamiento derivado de esta propiedad es su interacción con membranas lipófilas, en concreto con membranas de origen biológico. Varios estudios establecen que la curcumina se localiza, en membranas biológicas, en centros ricos en hidrocarburos.

Gracias al carácter anfipático, aunque preferentemente lipófilo, la curcumina también puede interactuar con los residuos proteicos transmembranosos polares gracias a la presencia del grupo dicetónico, los hidroxilos fenólicos y el grupo metoxiéter.

f) Rotación alrededor de enlaces C-C

El tautómero enólico de la curcumina posee 5 enlaces C-C libres de giro, mientras que el tautómero diceto posee 6 enlaces que pueden girar libremente (Figura 8, marcados en rojo).

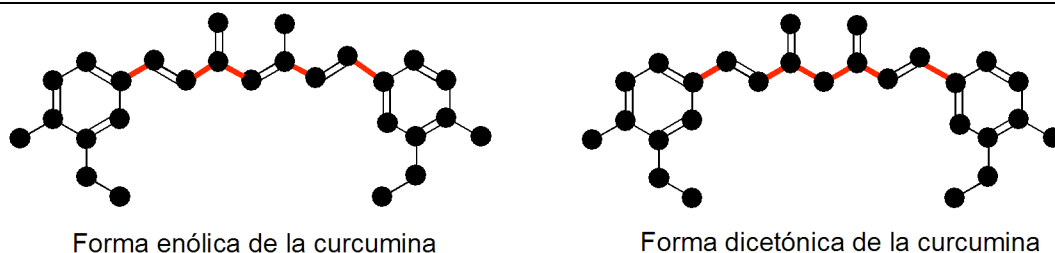


Figura 8. Posibilidades de rotación en la curcumina.

Esta flexibilidad conformacional hace que se pueda unir a una amplia variedad de residuos al poder adaptar la conformación más adecuada para maximizar el número de enlaces de H.

g) Comportamiento como aceptor de Michael

Recordemos que la reacción de Michael, o adición de Michael, consiste en la adición de un carbanión u otro nucleófilo a un compuesto carbonílico α,β -insaturado. En el contexto de esta revisión debemos distinguir dos casos: i) la adición de Michael está relacionada con la bioquímica de la curcumina y el nucleófilo es un tiol [o un derivado de selenio, como la tioredoxina reductasa (28)]; ii) la reacción se usa para modificar la estructura de la curcumina y para ello se usan diferentes nucleófilos.

La reacción de tioles con alquenos deficientes en electrones para formar enlaces C-S es una etapa

determinante en la biosíntesis de muchos compuestos biológicos (29). Ejemplos que implican a la curcumina se encuentran en las siguientes referencias: (30-35).

Síntesis que suponen la formación de enlaces C-C por reacción de Michael de la curcumina han sido descritos en varios artículos, por ejemplo (36,37).

2.2. Estabilidad

Efecto del pH (38). La curcumina es estable a pH ácidos pero inestable a pH básicos y neutros. Variando el pH, la curcumina existe de formas diferentes, que se presentan en la Figura 9. Se atribuye la elevada estabilidad de la curcumina en medio ácido a la estructura de dieno conjugado, que en condiciones neutras o básicas es destruida al ser desprotonado el OH fenólico.

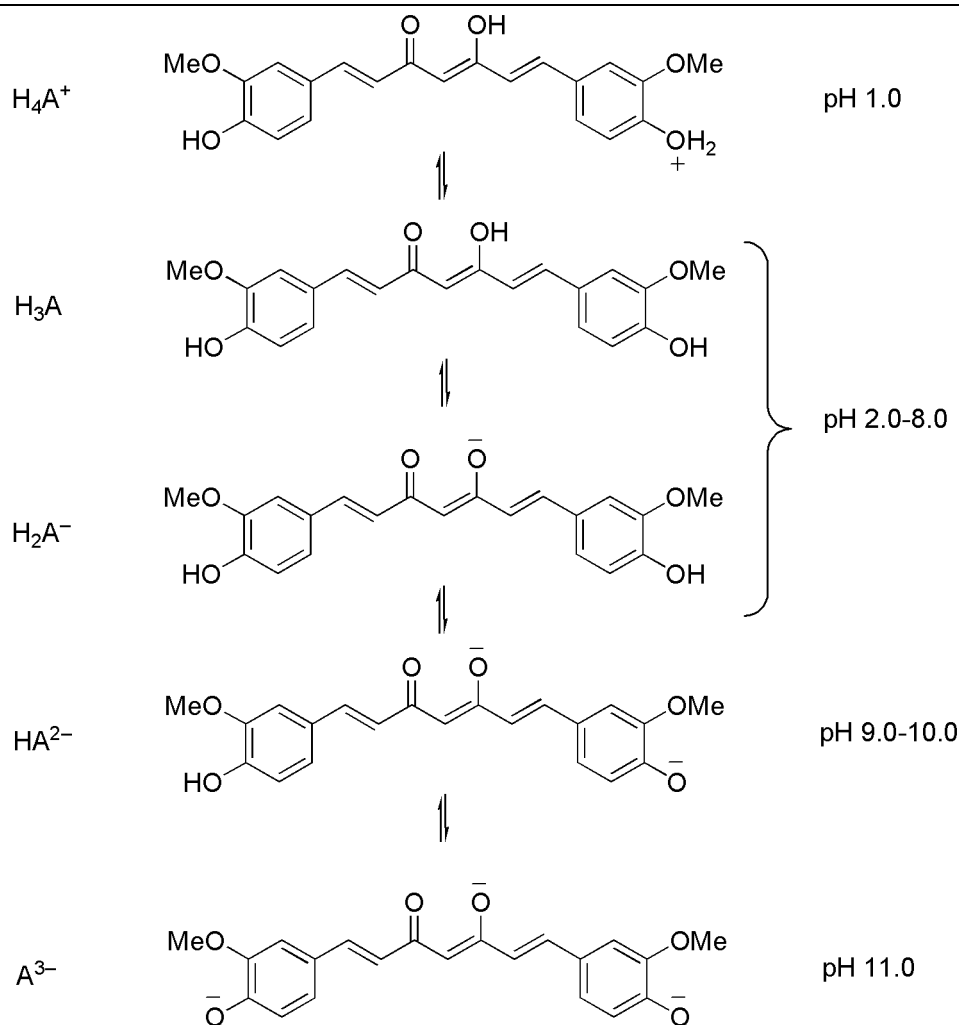


Figura 9. Equilibrios ácido-base de la curcumina.

En lo que concierne al efecto de la temperatura, la curcumina es estable a temperaturas bajas y moderadas (<80-100 °C), pudiendo manejarse sin problema a temperatura ambiente. Descompone a altas temperaturas.

2.3. Degradación

La curcumina es una molécula fotosensible, siendo este el principal método de degradación molecular, además de la degradación química (39). Se ha demostrado que los productos de degradación son bioactivos y contribuyen a los efectos farmacológicos de la curcumina (40).

2.3.1. Degradación química

En la curcumina, la degradación química se produce por oxidación mediante peróxidos, radicales libres, e iones oxígenos (las llamadas especies reactivas del oxígeno, ROS).

También puede degradarse mediante ataques de NO, radicales dinitrógeno, *t*-butilhidroperóxido, etc. Esta degradación química está relacionada con la energía de disociación de los grupos funcionales de la curcumina. Así los OH fenólicos poseen en torno a 80 kcal·mol⁻¹ de

energía de disociación, 90 kcal·mol⁻¹ para el H central y 98 kcal·mol⁻¹ para el H enólico. Estos datos permiten anticipar que los primeros grupos en ser atacados en la degradación química serán los OH fenólicos. Schneider C. *et al.* han discutido la relación entre degradación y metabolismo y sugieren que la polifarmacología de la curcumina puede estar ligada a sus numerosos productos de degradación (41).

2.3.2. Degradación fotoquímica

La curcumina posee grupos cromóforos y es, por lo tanto, fotosensible. La degradación fotoquímica se produce independientemente del entorno químico y tiene lugar incluso en estado sólido. Sin embargo, la composición, la cinética y la abundancia relativa de los productos de degradación difieren dependiendo del estado físico del compuesto y las condiciones de la degradación.

La degradación fotoquímica a través de luz visible ocurre mediante especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) producidas por la curcumina a través del estado triplete de esta. Este procedimiento se da a través de la llamada transferencia fotogenerada al

oxígeno molecular y transferencia energética a ROS. Notemos que se han descrito colorantes derivados de curcuminoides, que tienen una excelente fotoestabilidad (42).

Una vez vistos los diferentes mecanismos de degradación, la Figura 10 contiene los productos de la

degradación de la curcumina: el (2*Z*,5*E*)-2-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-oxohexa-2,5-dienal (6), el feruloilmetano (7), el ácido ferúlico (5) y la vainillina (8) (38, 43,44).

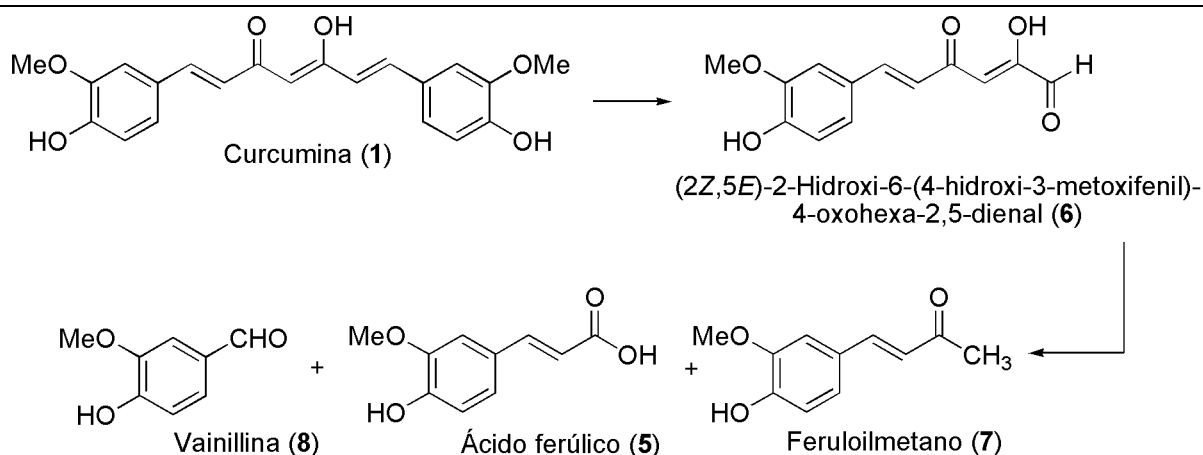


Figura 10. Productos de degradación de la curcumina.

2.4. Estructura cristalina

La curcumina presenta polimorfismo (45): tres formas cristalinas han sido caracterizadas por difracción de rayos X (trimorfismo), con colores que van del rojo oscuro al naranja; este problema y su relación con cristalografía, RMN de estado sólido (técnica CPMAS), cálculos teóricos (HOMO/LUMO) y tautomería han sido magníficamente discutidos por Šket B. *et al.* (46). En la base de datos de Cambridge (47) se encuentran nueve estructuras de la curcumina, todas llamadas BINMEQ (nada, 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07 y 08), la más antigua de 1982 (48) y la más

reciente de 2012, BINMEQ08 (49). Un polimorfo pertenece (BINMEQ, el de 1982) al grupo *P2₁/n* y tiene una molécula independiente en la celdilla unidad ($Z' = 1$) y los dos otros a los grupos *Pca2₁* (BINMEQ06, dos moléculas independientes, $Z' = 2$) y *Pbca* (BINMEQ07, una molécula independiente, $Z' = 1$) (50). La relación entre estabilidad y polimorfismo de la curcumina ha sido discutida (51).

En la figura 11 está representada la estructura de BINMEQ06.

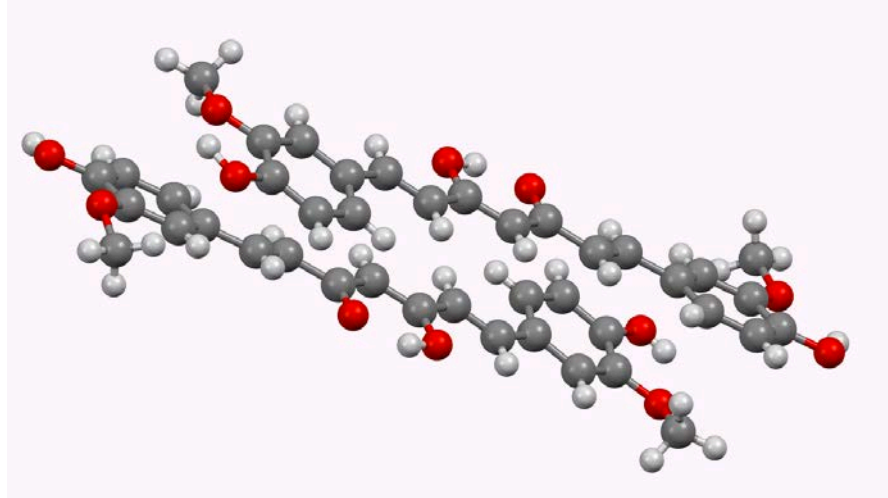


Figura 11. Estructura del polimorfo BINMEQ06 de la curcumina.

En todos los casos, la curcumina cristaliza como el tautómero *cis*-enol (1b) pero aparecen diferencias notables en el enlace de hidrógeno intramolecular (IMHB, intramolecular hydrogen bond). En primer lugar la

conformación del anillo de 4-hidroxi-3-metoxifenil cambia, en el polimorfo *P2₁/n* están en situaciones *sZ/sE* con respecto a los átomos de oxígeno del ceto-enol, mientras que en los polimorfos *Pca2₁* y *Pbca* están del

mismo lado (*sZ/sZ*).

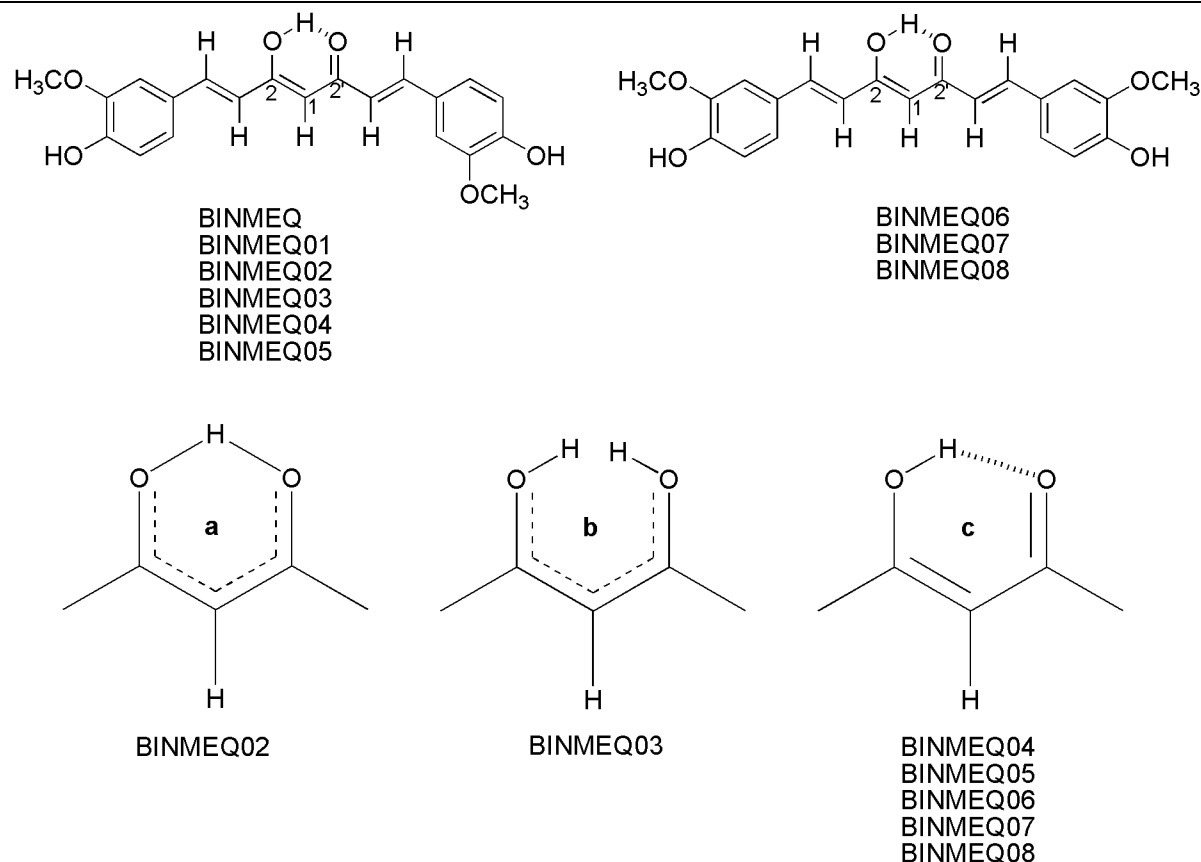


Figura 12. Estructuras cristalográficas de la curcumina.

En lo que se refiere al pseudoanillo central, las tres posibles situaciones se encuentran representadas en la Figura 12. En **a**, la corta distancia $O\cdots O$ lleva al protón a ocupar una posición central; esto es posiblemente un artefacto y la estructura debe ser de tipo **b** o **c**. La estructura **b** corresponde a la presencia de los dos tautómeros de tipo **1b** bien en desorden estático bien en dinámico; finalmente la estructura **c** es la esperada para **1b**.

También se han descrito cocristales de curcumina con resorcinol y con pirogalol; estos cocristales se preparan por

pulverización (molienda o grinding) en un mortero de ágata añadiendo 5 gotas de etanol (liquid assisted grinding) y son mucho más solubles que la propia curcumina en etanol-agua (52). La caracterización del cocrystal curcumina-floroglucinol ha sido particularmente difícil (53).

2.5. Estudio cuántico de los orbitales de la curcumina

Mediante métodos *ab initio* se ha podido establecer la naturaleza anfipática de la molécula, resultando la distribución de cargas en ambos tautómeros (46,54).

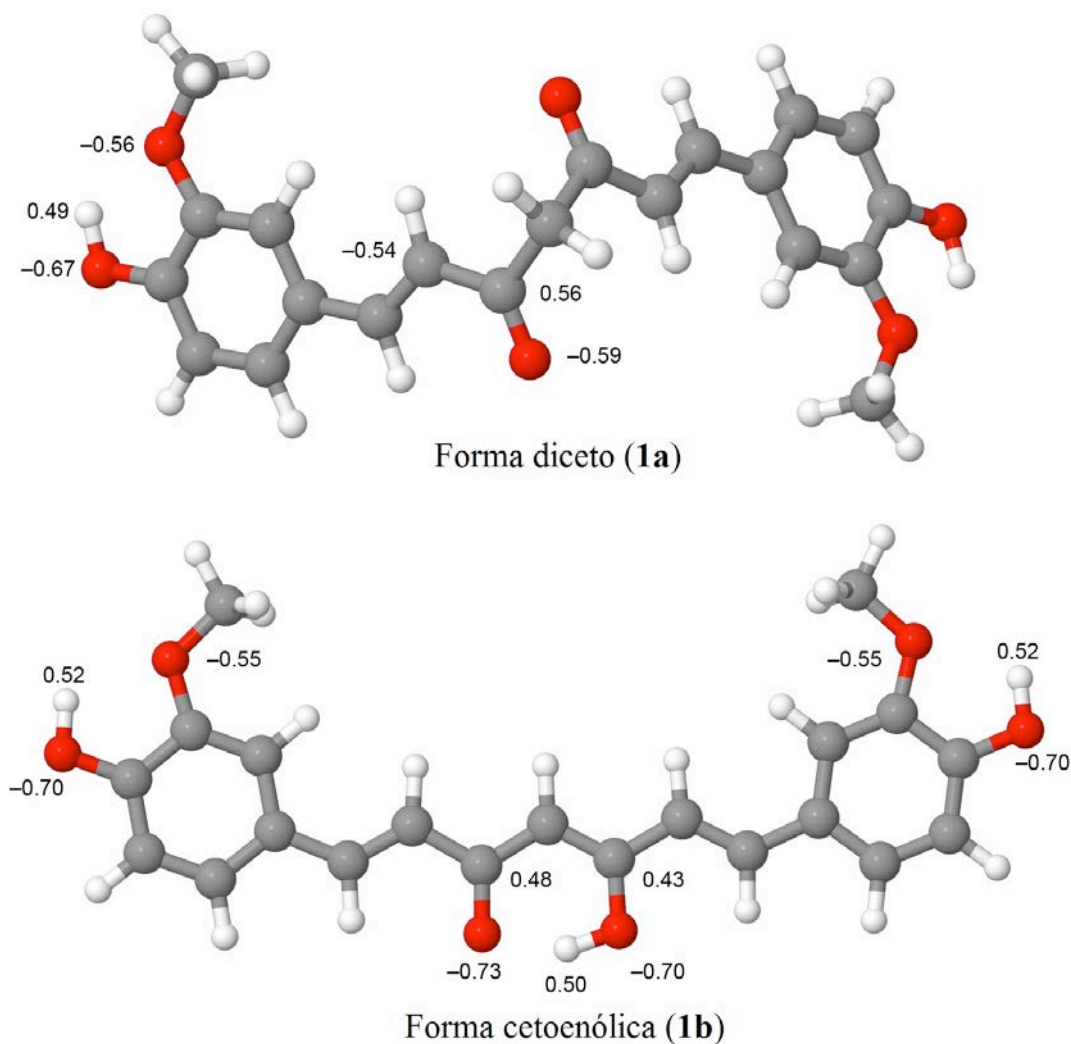


Figura 13. Distribución de cargas en los dos tautómeros de la curcumina (adaptado de las referencias 46,54).

La distribución de cargas representada en la Figura 13 explica tanto su solubilidad como la facilidad para penetrar membranas biológicas lipófilas. Por otro lado, cálculos

mecano-cuánticos permiten entender la reactividad de la curcumina a través de sus orbitales moleculares (Figura 14) (54,55).

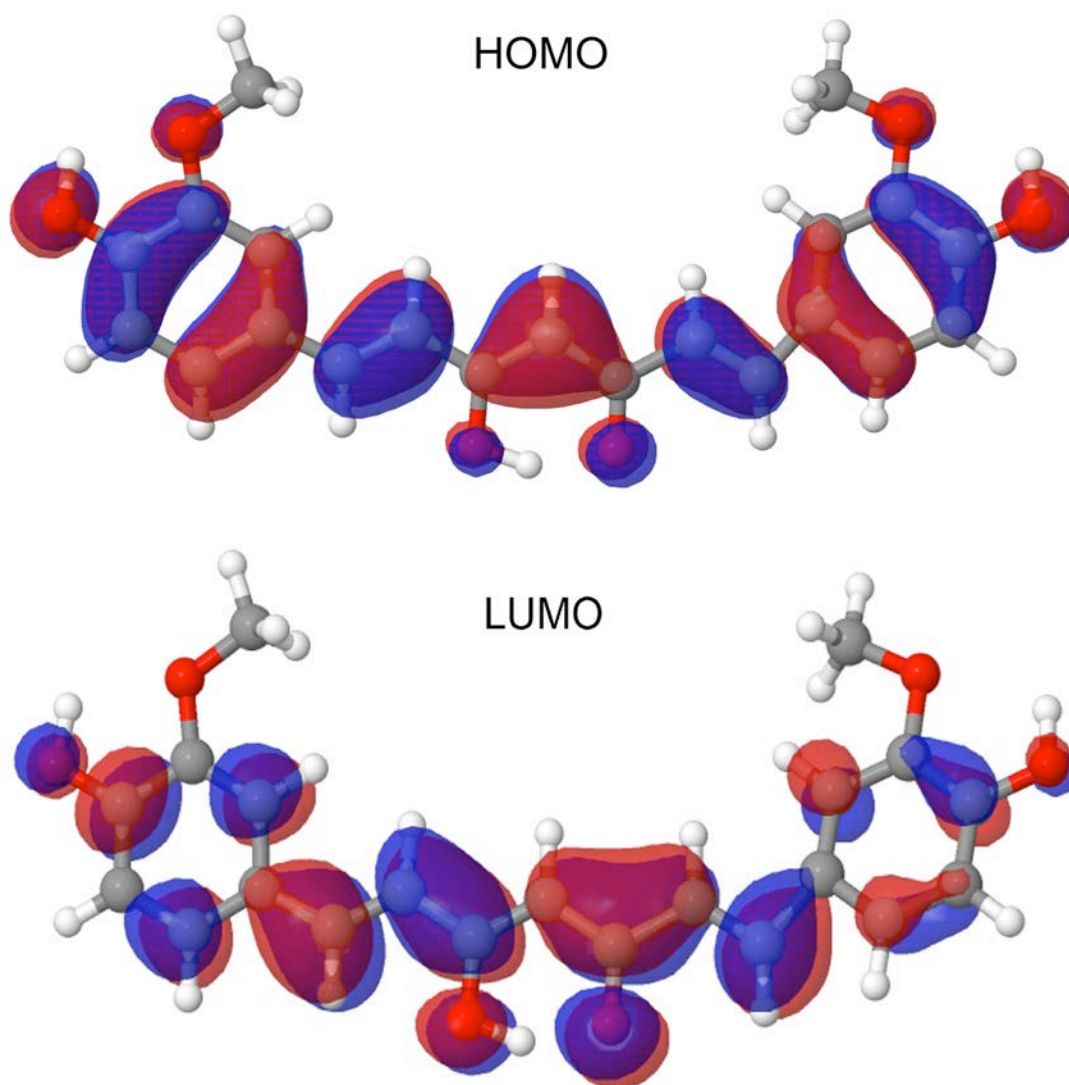


Figura 14. Orbitales moleculares del tautómero 1b de la curcumina (adaptado de las referencias 54,55)

Se puede observar la alta deslocalización de los orbitales HOMO confirmando que los enlaces entre la curcumina y otras moléculas se dan por transferencia electrónica del orbital π HOMO, a la molécula diana seguido de una transferencia de carga de la molécula diana al orbital π^* LUMO. Asimismo la coloración de la curcumina se puede atribuir a transiciones de transferencia de carga $n-\pi^*$. Ambos átomos de oxígeno de los grupos metoxi están ligeramente implicados en el HOMO pero no en el LUMO.

La poca diferencia energética entre los orbitales HOMO y LUMO y cálculos de ionización, confirman la baja dureza del compuesto (teoría HSAB, Hard and Soft Acids and Bases) (56) y su tendencia a desprotonar fácilmente los OH fenólicos estabilizándose por conjugación. Esta conjugación hace que la molécula se estabilice rápidamente después de unirse a un compuesto o centro activo.

2.6. Propiedades físicas

Para completar esta primera parte de análisis químico-estructural recordaremos de manera sucinta algunas propiedades físicas del compuesto:

- El aspecto físico de la curcumina es el de un polvo amarillo si cristaliza en medio ácido y rojo si lo hace en medio neutro-básico, formado por finas agujas.
- Punto de fusión de 183 °C.
- Picante, olor fresco reminiscencia de dulce de naranja y jengibre.
- Ligeramente acre, sabor amargo.
- Ligeramente fluorescente.
- Densidad: 1.28 g/cm³.
- Número de registro CAS, 458-37-7.

3. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN

3.1. Métodos de extracción

El aislamiento y purificación de la curcumina es complicado y funciona con bajos rendimientos. Los extractos purificados de las tres especies curcuminoides arrojan un porcentaje de 75-81% de curcumina (**1**), 15-19% de desmetoxicurcumina (**2**) y 2.2-6.6% de bisdesmetoxicurcumina (**3**). A continuación se enumeran algunos métodos de extracción de las tres especies curcuminoides:

- Como se comentó en el apartado anterior, la curcumina es soluble en disolventes orgánicos e insoluble en agua, por lo que obviamente un primer método de extracción se realiza mediante disolventes orgánicos.

Así Janaki N. y Bose J. L. en 1967 (57), extrajeron los rizomas molidos y secos con hexano. Posteriormente, utilizaron benceno separando los curcuminoides de los aceites y grasas presentes en la planta, aunque con un rendimiento muy bajo del 1.1%. Para su purificación se recrystalizó en etanol.

Otros métodos de extracción con disolventes orgánicos dan rendimientos entre el 2% y el 5% (hexano-metanol, por ejemplo). En caliente, los rendimientos incrementan moderadamente.

- La extracción con fluidos supercríticos mejora el rendimiento obtenido (58). Así, en el año 2000, Baumann W. *et al.* obtuvieron un 10% (59).

- Mediante la extracción asistida por microondas (MAE), técnica mas selectiva y rápida y con posibilidad de realizarla en polvo, irradiando con microondas la muestra entre 2 y 4 min. se obtuvo un rendimiento ligeramente superior a los anteriores (60).

- Por último los menores rendimientos se obtienen mediante la técnica de hidrodestilación.

3.2. Métodos de identificación

La curcumina es una molécula cromófora que absorbe luz a una longitud de onda determinada. Por espectrofotometría UV se localiza un pico de máxima absorción hacia 425 nm (Figura 15). Naturalmente, el espectro depende del pH y del disolvente (61,62).

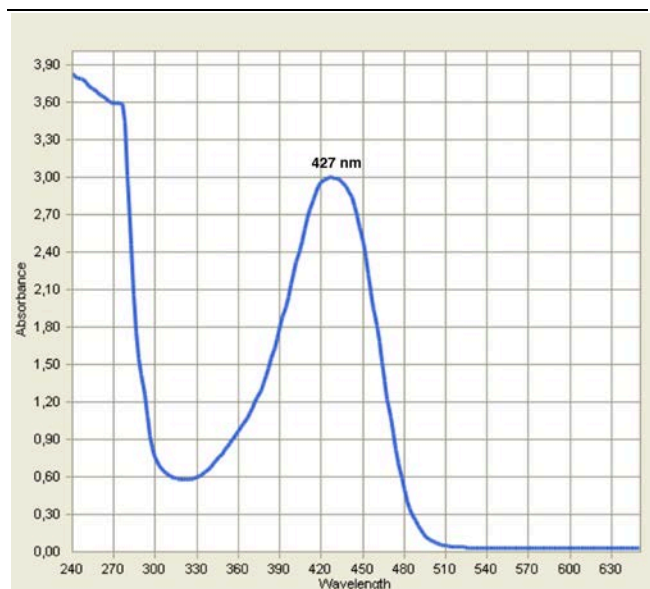
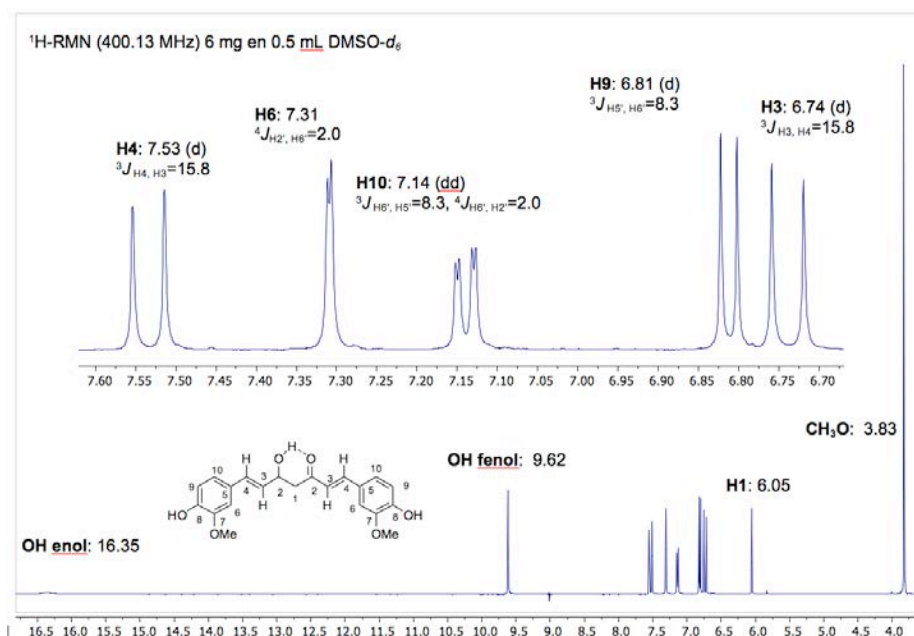


Figura 15. Espectro ultravioleta de la curcumina en etanol 95% determinado con un espectrofotómetro UV-visible Varioskan de Thermo Scientific.

Por otra parte los espectros RMN tanto de ^1H como de ^{13}C (Figura 16) permiten la identificación de la curcumina.



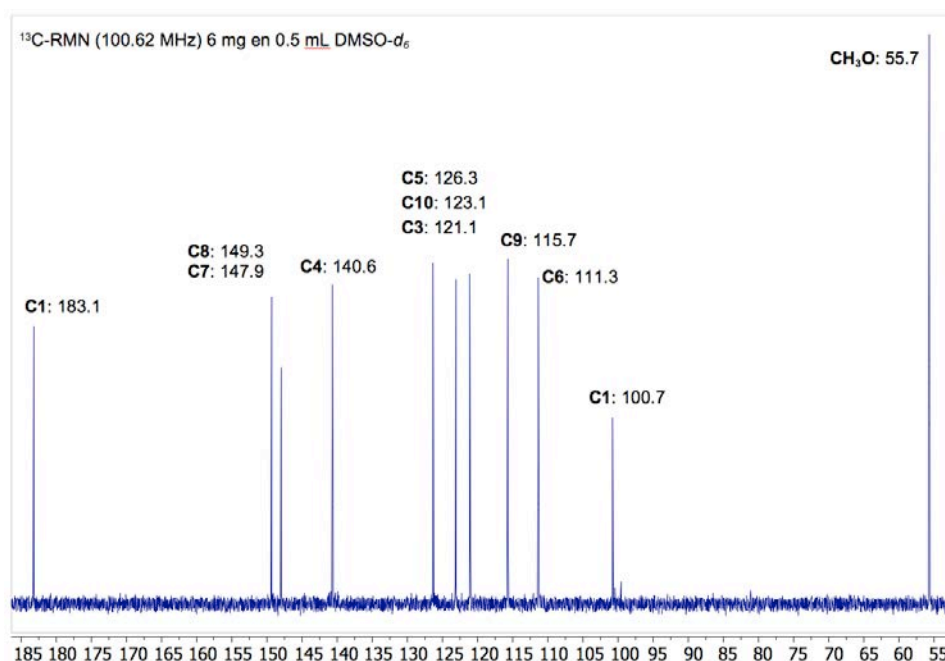


Figura 16. Espectros RMN (^1H y ^{13}C) en $\text{DMSO}-d_6$ del tautómer 1b la curcumina; registrados en un espectrómetro Bruker DRX 400 (9.4 Tesla) a 300 K.

Para el uso de la RMN de estado sólido en la caracterización de los polimorfos de la curcumina (46). Dicha técnica ha sido utilizada para estudiar el efecto de la curcumina sobre la estructura de membrana artificiales (63).

Otro método complementario a la RMN para identificar y determinar la estructura es la espectrometría de masas, que permite conocer los patrones de

fragmentación de la molécula y a partir de estos reconstruirla (Figura 17). Así en el caso de la curcumina, el uso combinado de la cromatografía de gases y de la espectrometría de masas ha permitido la determinación cuantitativa de los ocho componentes del rizoma y de la raíz tuberosa de la *Curcuma longa* (64).

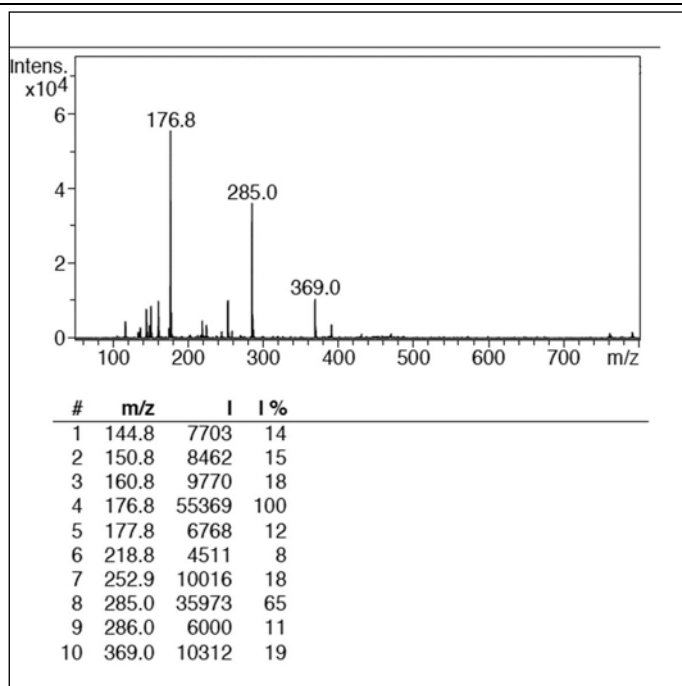


Figura 17. El espectro de masas de la curcumina realizado mediante LC-MS con un equipo de HPLC 1100 de Agilent acoplado a un Espectrómetro de Masas de Trampa de Iones Bruker, modelo Esquire 3000.

La espectroscopía infrarroja (Figura 18) permite la identificación sobre todo de grupos funcionales. Mucho menos potente que la RMN o la espectrometría de masas,

es más una técnica de identificación que de determinación, aunque obviamente complementa a las anteriores.

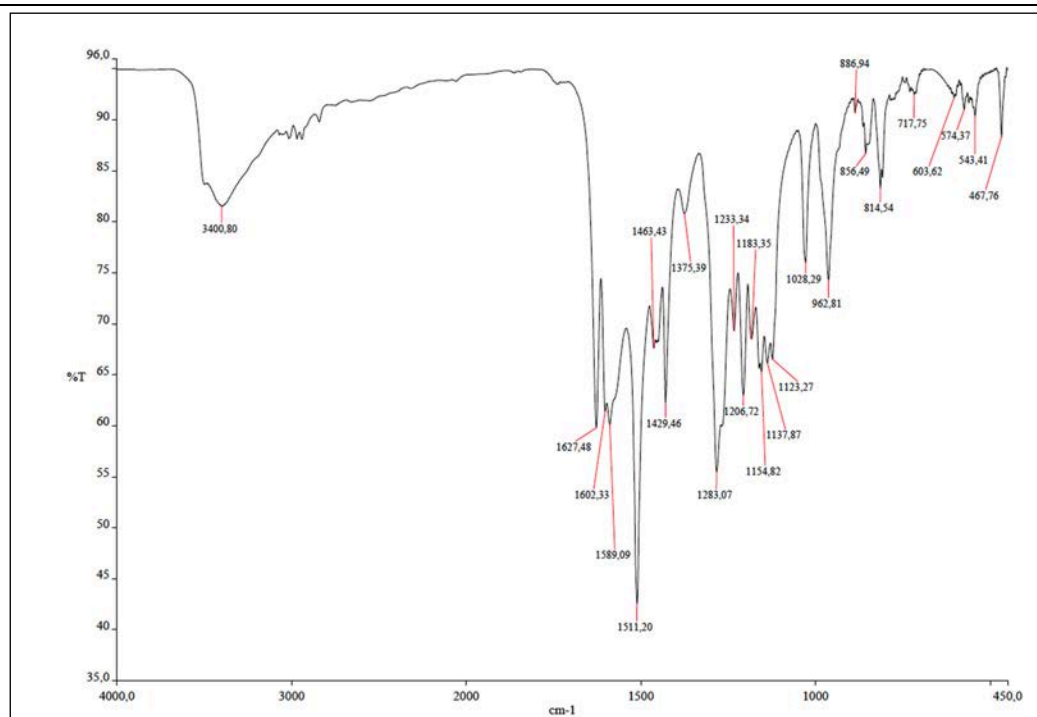


Figura 18. Espectro infrarrojo de la curcumina en pastilla de KBr; registrado en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR modelo Spectrum-One.

En el espectro se detecta una banda de tensión O-H enlazado a un aromático a 3400 cm^{-1} . Asimismo se observa el perfil de la banda intensa de C=O sobre los 1500 cm^{-1} . En la región de la huella dactilar del IR se puede observar el perfil de un grupo aromático trisustituido (2 bandas alrededor de 800 y 850 cm^{-1}). La curcumina y los otros componentes de la cúrcuma han sido separados por HPLC y caracterizados por espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR, near infrared spectroscopy) (65).

La técnica de separación que ofrece resultados más satisfactorios es la cromatografía. Además de separación molecular, puede servir de identificador atendiendo al perfil de velocidades de elución. Esta técnica se puede realizar mediante varios métodos.

En la Figura 19 se representa el perfil cromatográfico obtenido para una disolución $0,5\text{ mg/ml}$ de curcumina en metanol, y donde el pico con un tiempo de retención de 3 minutos pertenece a la curcumina.

3.3. Métodos de separación

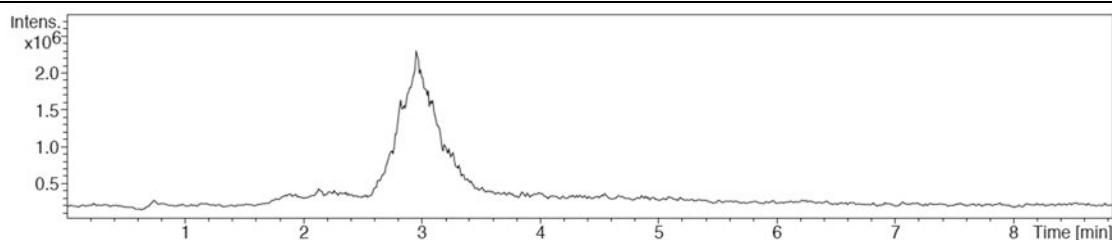


Figura 19. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de la curcumina.

La cromatografía en capa fina ha sido utilizada con éxito para separar los componentes 1-3 de la cúrcuma (66). También se ha aplicado la cromatografía de fluidos supercríticos (SCF de supercritical fluid chromatography), método que utiliza fluidos en el punto crítico de presión, capaces de eluir más rápidamente y dar una resolución mayor (67).

4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La curcumina presenta un importante potencial terapéutico, debido a la diversidad de moléculas diana sobre las que puede actuar, en diferentes patologías (Figura 20).

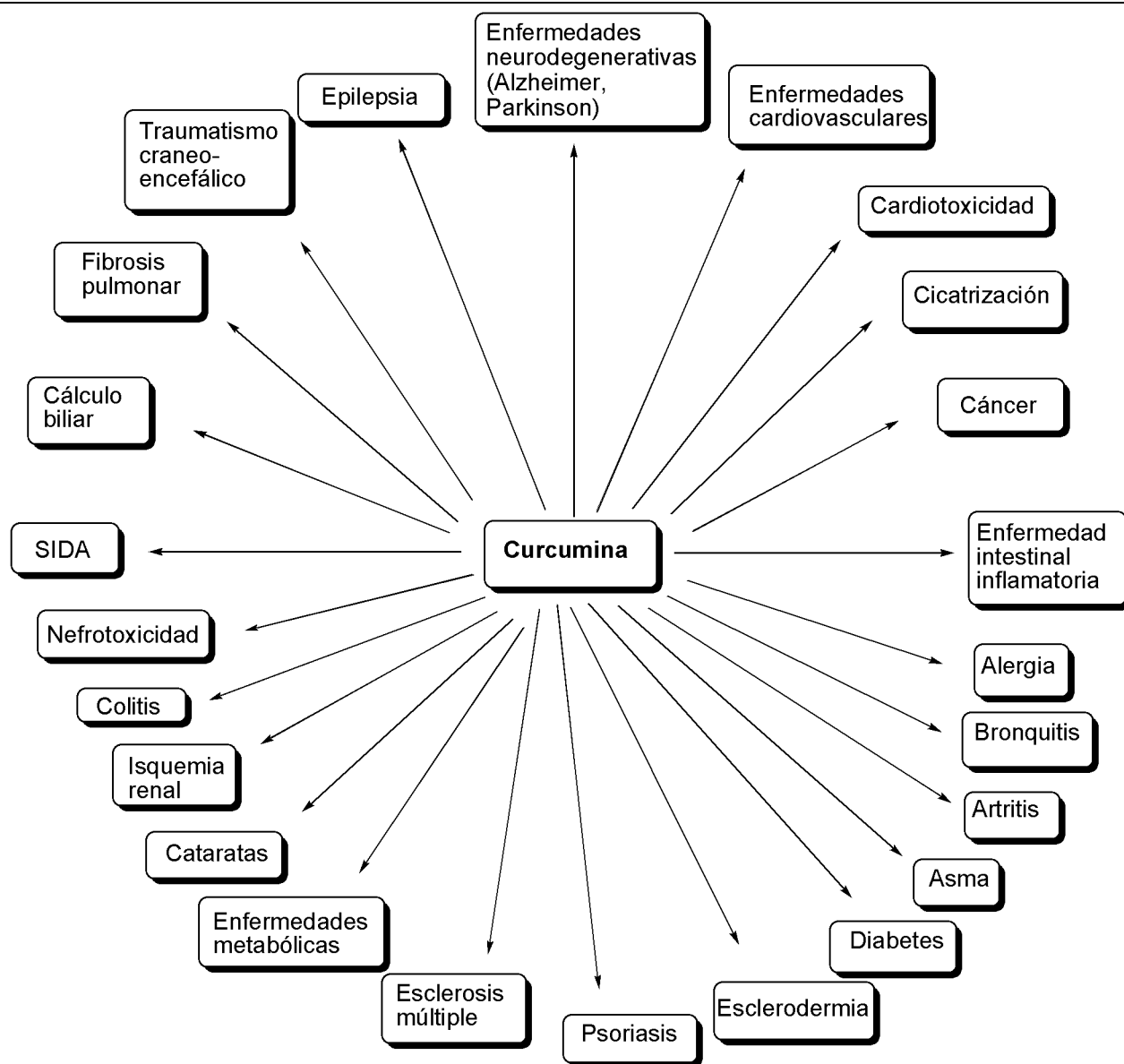


Figura 20. Actividades biológicas de la curcumina.

Debido a que es una molécula altamente pleiotrópica o pluripotente, la curcumina presenta diferente actividad biológica dependiendo del nivel estructural en el que nos centremos. Puede actuar directamente y modular la actividad de moléculas diana, o puede actuar indirectamente para regular determinadas funciones. Se han encontrado más de treinta proteínas diferentes que interactúan directamente con la curcumina, incluyendo ADN polimerasa, quinasa de adhesión focal (FAK), tioredoxina (TRX) reductasa, proteína quinasa (PK) C, lipoxigenasa (LOX), tubulina, el factor nuclear-kappa B (NF- κ B) y la actina (68). También se ha demostrado que la curcumina puede unirse a ciertos iones metálicos divalentes tales como Fe, Cu, Mn y Zn formando complejos con alto potencial farmacológico.

4.1. Mecanismos de acción de la curcumina

En este apartado se estudiarán algunos ejemplos del mecanismo mediante el cual la curcumina actúa sobre determinadas moléculas en diferentes enfermedades.

4.1.1. Comportamiento anticancerígeno.

Las citas bibliográficas sobre las relaciones de la curcumina con el cáncer son muy numerosas, por ello sólo incluimos algunas (69-82). El principal mecanismo de la curcumina sobre las células cancerígenas, es inducir la apoptosis de dichas células.

Una hipótesis aceptada es que la curcumina altera el ciclo celular mediante tres vías (83):

- vías dependientes de ciclina;
- vías independientes del factor de transcripción p53;

- vías dependientes del factor de transcripción p53.

Para comprender el proceso de la apoptosis, primeramente se describirá sucintamente el factor de transcripción p53, en cuyo funcionamiento está implicada la tioredoxina reductasa, enzima esta última sobre la que actúa la curcumina y sus derivados.

Un factor de transcripción es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa. Los factores de

transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa. En concreto el p53 regula la apoptosis. Para romper la unión necesita la intervención de la tioredoxina reductasa (28,84,85). Las tioredoxinas son proteínas que actúan como antioxidantes, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. Su estructura está representada en la Figura 21.

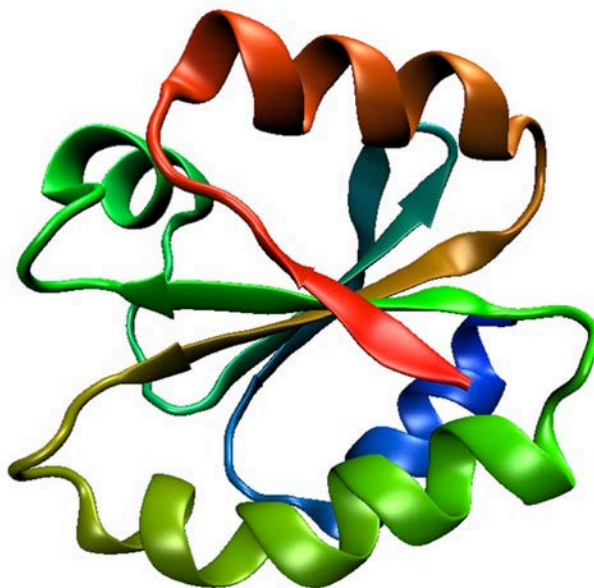


Figura 21. Estructura de la tioredoxina.

La curcumina, como se descrito anteriormente, produce la inhibición irreversible de la enzima debido a la unión covalente de Cys496/Sec497 en el sitio catalíticamente activo de la enzima mediante una adición de Michael (28).

En la Figura 22, se muestran las interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno de la curcumina (nótese que en dicha figura falta un grupo metoxi) con el centro o sitio activo de la tioredoxina (86).

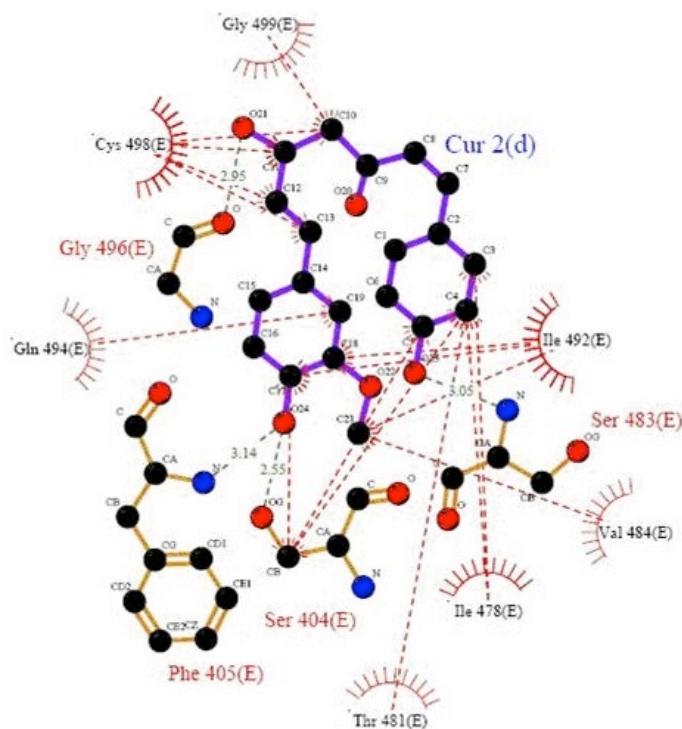


Figura 22. Curcumina en el sitio activo de tiorredoxina.

El poder de inhibición de la curcumina reside en la propia estructura de la molécula. La relación estructura-actividad viene determinada por el hecho de que la curcumina se pliega de tal manera que los grupos funcionales son capaces de interactuar con el centro activo de la tiorredoxina e inhabilitar la enzima.

Como la actividad anticancerosa de la curcumina está limitada por su pobre absorción, se han hecho muchos esfuerzos por mejorarla. Una combinación borneol/curcumina ha sido ensayada con éxito (87).

4.1.2. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

En 2010 Martínez A. editó dos volúmenes sobre la enfermedad de Alzheimer (AD, Alzheimer disease) que son de lectura obligada para todos aquellos interesados en este tema. En el volumen 2 hay dos capítulos que tratan de la curcumina (88), en particular en lo que se refiere al factor nuclear kappa B (NF- κ B).

La enfermedad se caracteriza por lesiones neuropatológicas, que consisten en placas senílicas compuestas por depósitos extracelulares de β -amiloide y por ovillos interneuronales formados por neurofibrillas consistentes en filamentos enrollados de la proteína τ citoesquelética. En este caso la curcumina puede inhibir la formación de la placa de β -amiloide, así al inhibir estas placas proteicas en la sinapsis, los impulsos eléctricos conectan diferentes partes del cerebro, la memoria es preservada y los síntomas de la enfermedad son minimizados o eliminados (89).

Analizando la estructura de la curcumina para

establecer una relación estructura-acción, se puede determinar que esta posee dos características estructurales importantes que se han asociado con muchos inhibidores de pequeñas moléculas de amiloide: i) la presencia de anillos fenólicos capaces de interrumpir el apilamiento proteico y ii) grupos enol capaces de enlace de hidrógeno, interruptores de la hoja β . El grupo fenólico de la curcumina puede interactuar con los residuos aromáticos en fibrillas amiloides interrumpiendo en el péptido apilamientos π - π , mientras que los grupos hidroxilo y unidad de cetona α,β -insaturada pueden actuar como interruptores β -hoja a través de enlaces de hidrógeno competitivo. El componente de cetona α,β -insaturada también es capaz de quelar cobre que está implicado en la formación de ovillos de proteínas τ .

Muchas son las publicaciones que relacionan la curcumina con la enfermedad de Alzheimer, tanto en lo que concierne a las placas amiloides (A β) como a la hiperfosforilación τ (90). Así encontramos ejemplos de curcumina/ β -amiloide (91) [la curcumina es un colorante específico del péptido β -amiloide (92)], mejoras galénicas por formación de nanopartículas con PLGA (93)], híbridos de curcumina y melatonina (94). Curcuminoides que mejoran la inhibición de la auto-agregación *in vitro* del péptido β -amiloide han sido descritos, se trata de potentes neutralizantes (scavengers) de radicales libres (95). Una serie de modificaciones estructurales han llevado a Schubert D. de la curcumina al compuesto J147 (una hidrazona), pasando por un pirazol, capaz de restaurar los deterioros cognitivos en ratones con enfermedad de

Alzheimer (96). Al ser la curcumina un inhibidor de la proteína kinasa II calcio/calmodulina-dependiente (CaMKII) (97) actúa como neuroprotector. Un análogo de la curcumina (**34**, Figura 29) se ha usado para ver las fibrillas por fluorescencia de infrarrojo cercano (98).

4.1.3. Actividad frente al virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

La VIH-1 PR es una proteasa con dos aspárticos en el centro activo capaz de cortar las cadenas peptídicas que se sintetizan al traducir a proteínas el código genético del virus para propagar su ciclo de vida.

La integrasa VIH-1 IN, es una proteína que originalmente se encuentra en el interior del VIH, penetra en la célula, después de la fusión, junto con el resto del material genético del virus, facilitando que, después de la

transcripción inversa, el recién creado ADN viral se integre en el ADN de la célula humana. De este modo, se consigue alterar la programación de la célula para que fabrique VIH.

La curcumina actúa directamente sobre estas dos proteínas uniéndose a ellas, provocando su inhibición. Se ha modelado el acoplamiento (docking) de la curcumina a las proteínas VIH-1 IN y VIH-1 PR (99). En la primera juega un papel importante el ión Mg^{2+} del centro activo. Como se ve hay muchas interacciones de enlaces de hidrógeno en las que participan el hidroxilo, el metoxilo o la estructura cetónica y la variada flexibilidad conformacional (Figura 23).

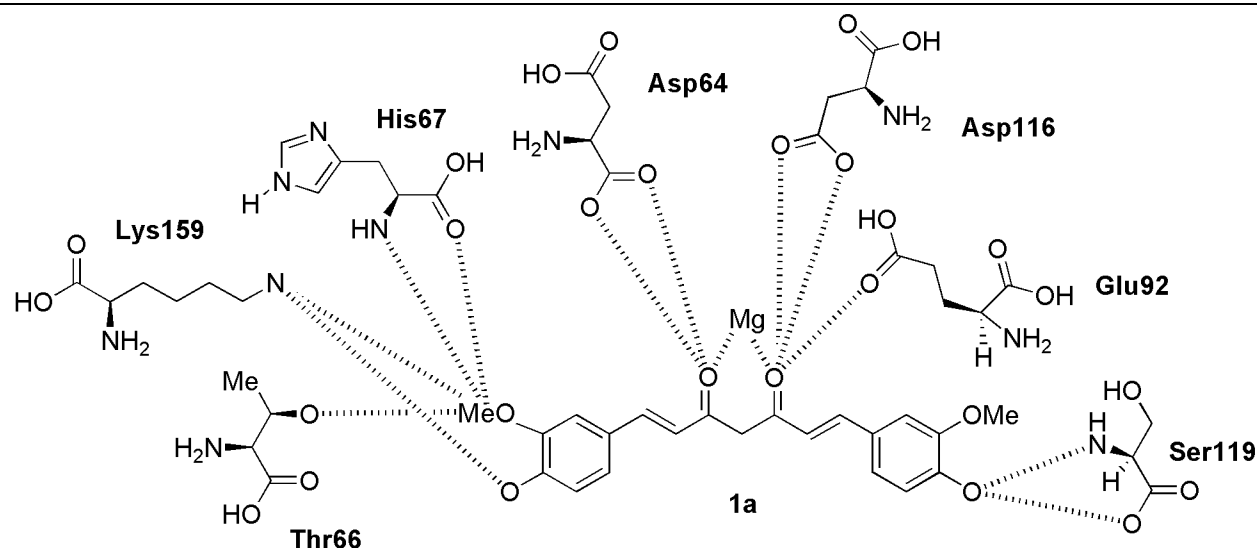


Figura 23. Acoplamiento de la curcumina con la proteína VIH-1 IN.

Pommier Y. *et al.* del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, Bethesda) han descrito como la curcumina inhibe la proteína integrasa (100-102). Se ha propuesto una combinación de curcumina y AZT (zidovudina o azidotimidina) para el tratamiento del SIDA (103).

4.1.4. Actividad de la curcumina como inmunosupresor

El efecto de la curcumina sobre la respuesta inmunológica ha sido estudiado y su relación con sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y quimioprotectoras discutida en detalle (104,105).

4.1.5. Comportamiento antiinflamatorio

La curcumina posee actividad antiinflamatoria mediante la unión directa a moléculas inflamatorias (106). Varias moléculas inflamatorias conocidas son: el factor de necrosis tumoral (TNF- α), la ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, la α 1-glicoproteína ácida humana (α 1-GA), y la proteína de diferenciación mieloide 2 (DM-2). Analizaremos solo la unión curcumina-TNF.

El TNF es un elemento esencial del sistema inmune

producido por varios tipos de células, especialmente macrófagos. Posee actividades pro-inflamatorias y puede contribuir a una variedad de enfermedades autoinmunes, incluyendo la psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y diabetes. La curcumina puede interactuar en los sitios de unión al receptor de TNF por acoplamiento molecular (107). Varios residuos, incluyendo Leu89, Asn90, Asp105, Asn106, y Cys129, del TNF se unen a la curcumina. La curcumina muestra una interacción directa con el TNF por interacciones no covalentes, tales como interacciones hidrófobas, interacciones π - π aromáticas en Tyr201, interacciones ión- π en Lys126 y enlaces de H. También puede influir o incluso interrumpir la señal de transducción entre TNF y su receptor por unión directa, y por lo tanto suprimir la inflamación inducida.

4.1.6. Comportamiento antioxidante

La curcumina y sus derivados carbocíclicos (análogos de **4**) son buenos agentes antioxidantes mostrando una

importante actividad frente a los radicales libres (108,109).

Los antioxidantes son sustancias que protegen a las células de los efectos de los radicales libres. Los radicales libres son moléculas producidas por diversas causas, entre las que se encuentran la exposición ambiental al humo del tabaco y la radiación, o bien cuando el cuerpo degrada los alimentos.

El mecanismo de oxidación puede seguir dos rutas (Figura 24). En una de ellas se forma un radical fenoxilo (PR1) en el grupo OH fenólico y en la otra es el grupo CH₂ de la heptanodiendiona quien pierde un H[•] para generar el correspondiente radical (CR1).

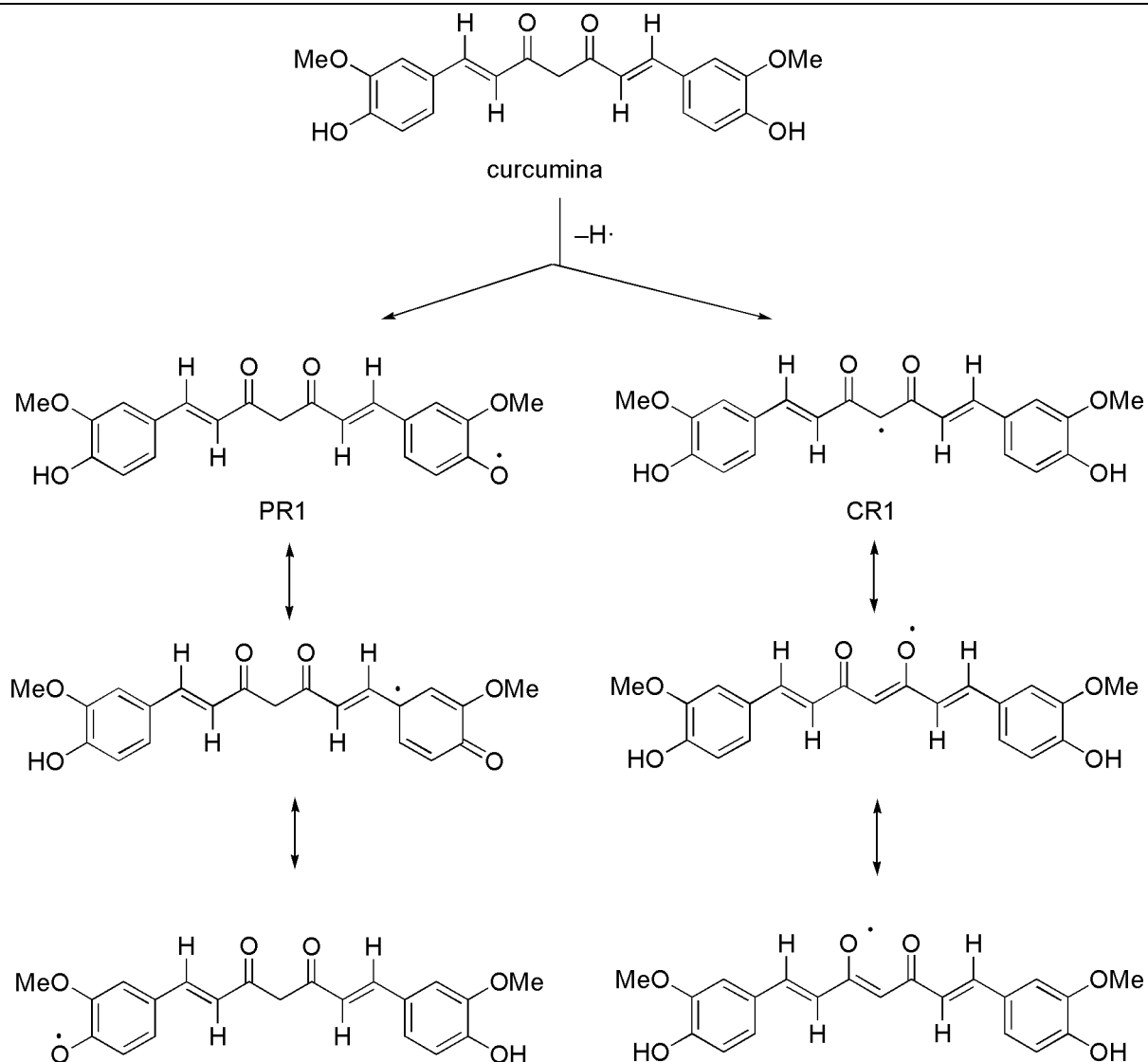
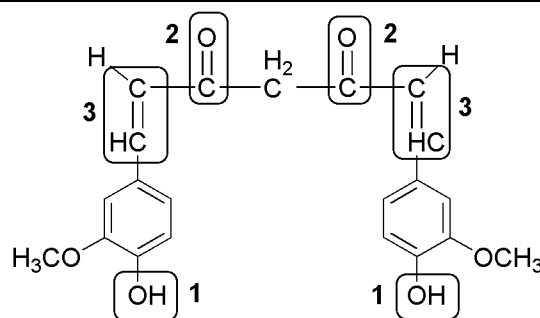


Figura 24. Mecanismos de oxidación de la curcumina.

Por estudios teóricos de la teoría del funcional de la densidad (DFT), se calcularon las energías de disociación del OH fenólico y el grupo CH₂ metilénico y se determinó que el OH fenólico poseía una energía de disociación menor que la disociación del enlace CH del CH₂ central de la curcumina **1a**, lo que sugiere que el OH fenólico es el grupo de mayor vulnerabilidad para los radicales libres en

la curcumina.

Como conclusión a este apartado podemos esquematizar la acción de la curcumina mediante la disección de la estructura por grupos de actividad (Figura 25).



1. Grupos hidróxilo: actividad antioxidante.
2. Grupos cetónicos: actividad antiinflamatoria, anticancerígena.
3. Dobles enlaces C-C: actividad antiinflamatoria, anticancerígena.

Figura 25. Propiedades de los diferentes fragmentos.

La capacidad antioxidante de la curcumina se debe a que la forma dicetónica **1a** es un potente dador de H[•] (110). El mecanismo de la transferencia intramolecular en el enol **1b** ha sido estudiado teóricamente por métodos *ab initio* y CIS, tanto para el estado fundamental como para el estado excitado (111). Experimentalmente, el carácter antioxidante ha sido ensayado de diferentes maneras, determinando la estructura de sus productos de oxidación (vainillina, ácido ferúlico, dímero) (112), usando los ensayos TRAP (radical trapping antioxidant parameter) y FRAP (ferric ion reducing antioxidant power, o también, ferric reducing ability of plasma) (113), y en relación con su propiedad como neutralizante de radicales libres (114).

La actividad antioxidante disminuye desde la curcumina (**1**) a desmetoxicurcumina (**2**) y a bisdesmetoxicurcumina (**3**) (115). Dos mecanismos, no contradictorios, han sido propuestos para el carácter antiinflamatorio de la curcumina: activación del receptor PPAR- γ (receptor activado por el proliferador de peroxisomas) (116) y unión selectiva al receptor cannabinoide CB1 (antagonista/agonista-inverso) (117). La curcumina es útil frente al estrés oxidativo y es neuroprotector de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino (118).

4.1.7. Relación con el óxido nítrico y las sintasas del óxido nítrico (NOS)

Se pueden resumir los trabajos que relacionan la curcumina con la sintasa del óxido nítrico (NOS) en dos grandes grupos: los de la isoforma inducible, iNOS y los

de la isoforma neuronal nNOS. Los primeros están relacionados con cáncer e inflamación (119-124) y los segundos con neuroprotección y déficit de memoria (125,126).

4.1.8. Otras enfermedades: fibrosis cística

Se ha descrito que la curcumina corrige los defectos de la fibrosis cística (FC). Ello se debe a que es un inhibidor no tóxico de la bomba Ca-adenosina trifosfato que puede ser administrada a humanos sin riesgo. Los autores concluyen que la curcumina y sus derivados son candidatos para la búsqueda de pequeñas moléculas útiles para el tratamiento de la FC y otras enfermedades relacionadas con el plegamiento de proteínas (127).

5. SÍNTESIS DE LA CURCUMINA, DERIVADOS Y ANÁLOGOS

5.1. Preparación de la curcumina

La curcumina fue sintetizada por primera vez en el año 1918 por Lampe a partir de cloruro de carbometoxiferuloilo y acetoacetato de etilo en cinco etapas y con bajo rendimiento. El método más ampliamente utilizado es el método de Pabon que consiste en la reacción de la vainillina (**8**) con acetilacetona (**9**) y óxido de boro (**10**), que dio un rendimiento inicial del 10% (128), pero que ha sido mejorado catalizando la reacción por tri-*t*-butilborato (**11**) y 1-butilamina (**12**) (Figura 26).

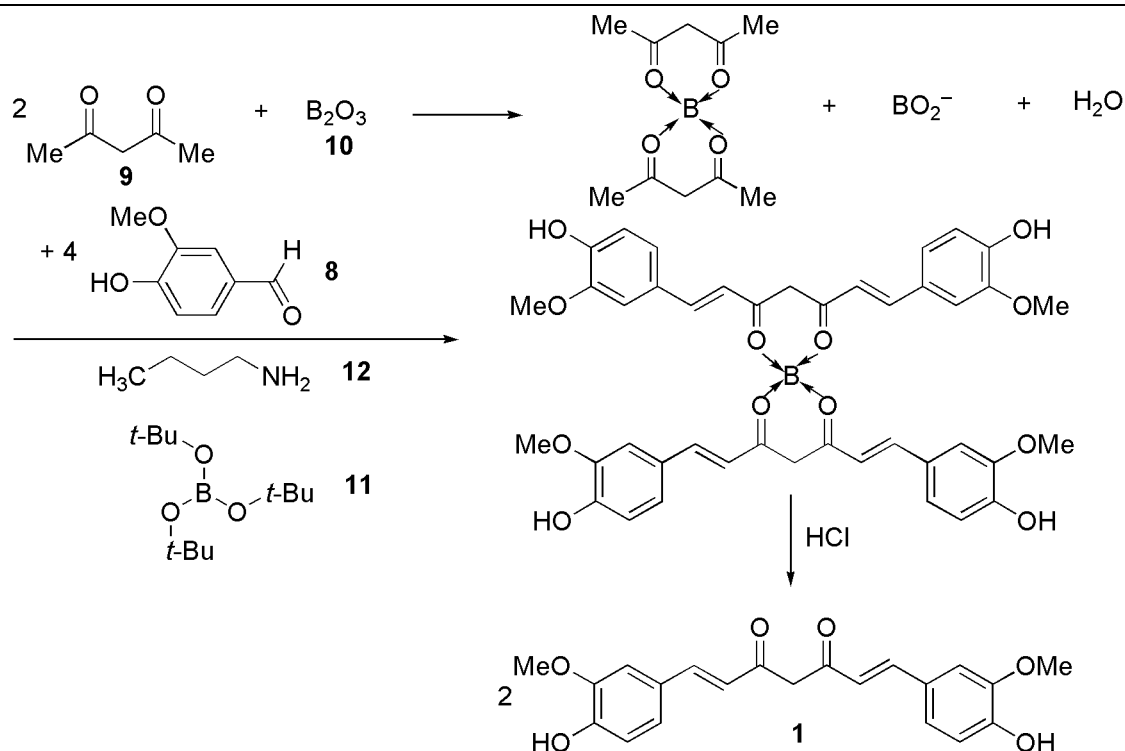


Figura 26. Síntesis de Pabon de la curcumina.

Se trata de una condensación aldólica en la que la acetilacetona actúa como nucleófilo. El boro tiene como objetivo la protección del grupo metileno central de la acetilacetona, realizando una condensación aldólica mixta, que tiene lugar en los metilenos terminales.

5.2. Derivados de la curcumina

Los derivados de la curcumina son los compuestos que mantienen el puente dicetónico α,β -insaturado de 7 carbonos con anillos bencénicos sustituidos, enlazados a ambos lados de este puente. Son sintetizados partiendo de la curcumina, y un ejemplo típico lo constituye la halogenación (cloración, bromación) regioselectiva de la curcumina en el carbono situado entre el carbonilo y el

enol (posición 1) mediante *N*-halosuccinimidas (46).

Los grupos fenólicos pueden ser acilados, alquilados, glicosilados y aminoacilados. Los grupos hidroxilo deben ser preparados por desmetilación del grupo metoxi; para la modificación del metileno del puente dicetónico se debe usar un grupo arilideno ($\text{Ar}-\text{CH}=\text{}$). Como ejemplo de derivados, la Figura 27 contiene las estructuras **13** y **14** (129). Los derivados bis-glicosilados de la curcumina son excelentes quelantes de Fe(III) (130). También se conocen derivados sililados (trimetil, trietil and tri-*t*-butil silil) en los tres OH de la curcumina, por ejemplo, tris-trimetilsililcurcumina (131).

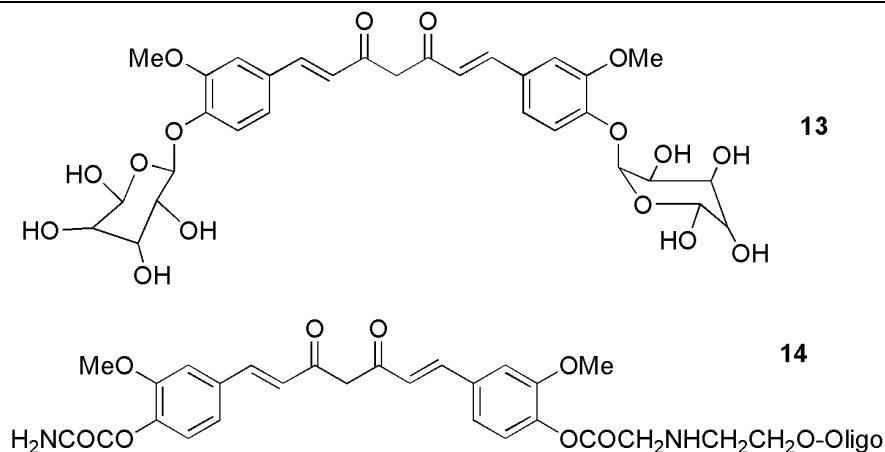


Figura 27. Derivados de la curcumina.

5.3. Análogos de la curcumina

Los análogos de la curcumina son los compuestos que presentan variaciones estructurales respecto a ella y se denominan curcuminoides. También se encuentran en este grupo aquellas estructuras resultantes de la reactividad del grupo dicetónico, por ejemplo como resultado de la

reducción o de su reacción con hidrazina, o los análogos monocarbonílicos representados en la Figura 5.

Los análogos se clasifican en naturales (Figura 28) y sintéticos (Figura 29).

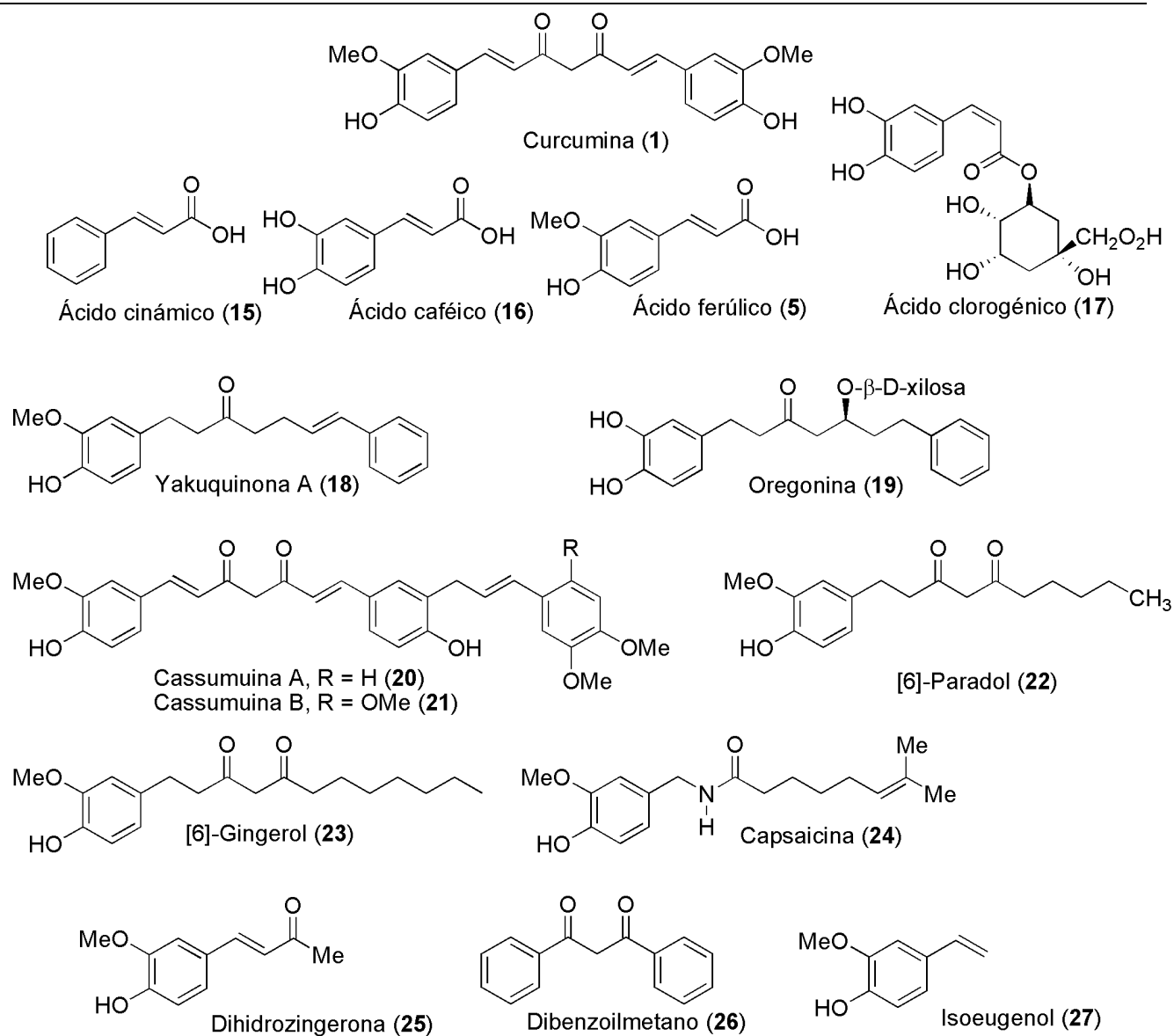


Figura 28. Análogos naturales de la curcumina.

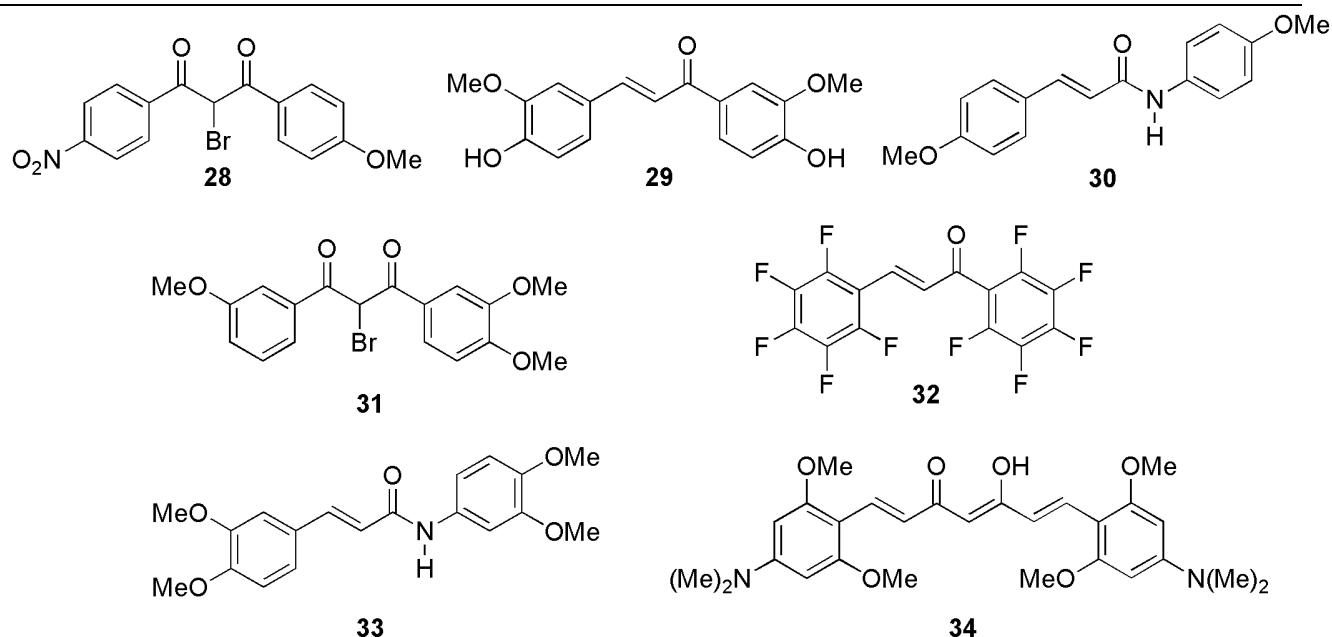


Figura 29. Análogos sintéticos de la curcumina.

En resumen, la molécula de curcumina presenta las siguientes zonas susceptibles de modificación estructural (Figura 30).

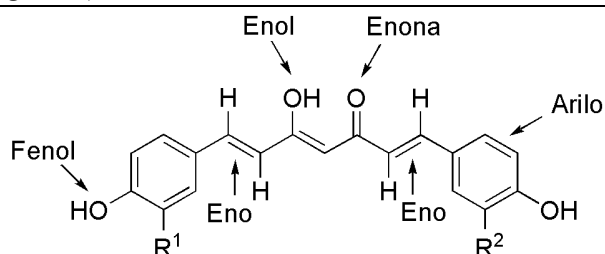


Figura 30. Zonas susceptibles de modificación estructural.

La actividad del análogo o el derivado sintético obtenido puede ser muy diversa, así por ejemplo los

análogos cíclicos suelen tener actividad anticancerígena, los derivados dipiperólicos y dactílicos presentan actividad antibacteriana, los análogos pirazólicos actividad antioxidante, etc.

5.4. Ejemplos de síntesis de derivados y análogos

Una vez introducidos los conceptos de derivados y análogos se exponen algunos ejemplos de síntesis actuales de los mismos.

a) Síntesis de derivados

Se muestra un ejemplo de acoplamiento de una sal de diazonio de anilina para la obtención de la serie de colorantes 35 (Figura 31) (132).

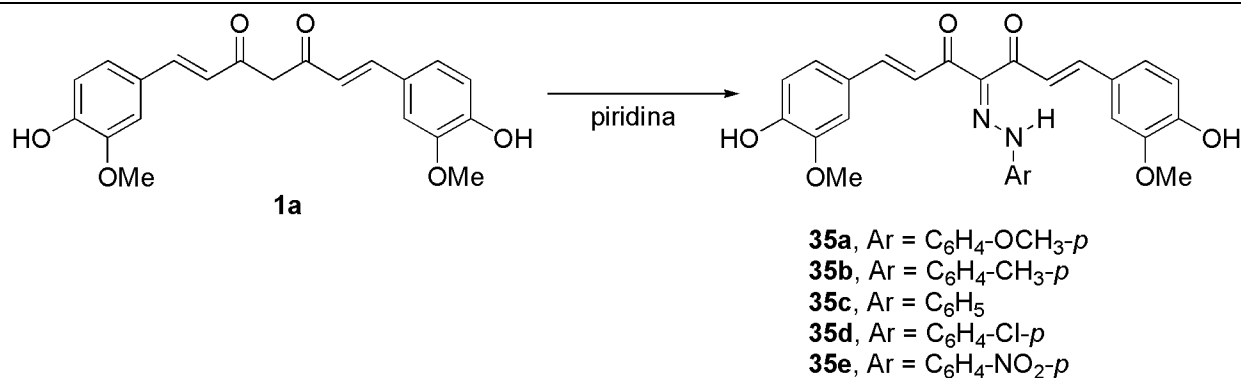


Figura 31. Colorantes derivados de la curcumina.

b) Síntesis de análogos de la curcumina asistido por microondas (MW)

Con este método se intenta diseñar una nueva vía de

síntesis de análogos mediante MW. Esto se debe a que aunque la curcumina es una 1,3-dicetona, su preparación no es fácil debido a que la condensación aldólica con la 2,4-pentanonodiona se ve obstaculizada por la alta acidez de

los H del C3, siendo mas ácidos que los de C1 y C5 por lo que debe llevarse a cabo a través del ion dienolato, difícil de obtener. Un ejemplo de esquema de reacción es el

representado en la Figura 32 (133).

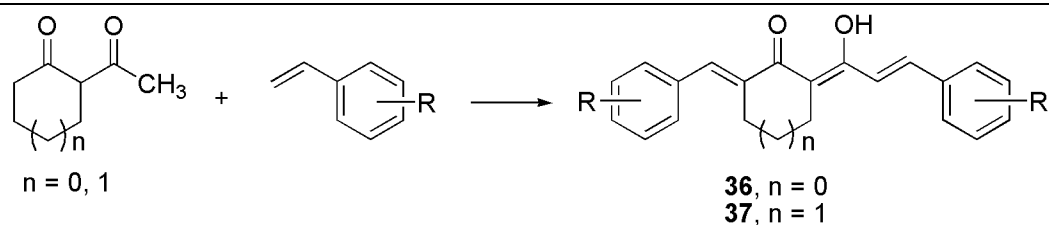


Figura 32. Síntesis de ciclocurcuminas.

c) Ciclodextrinas y curcumina

El objetivo de estas investigaciones está encaminado a mejorar la solubilidad y biodisponibilidad *in vivo* de la curcumina (134). Formalmente una reacción supramolecular (no se forman enlaces covalentes), pertenece al campo de la química anfitrión-huésped (host-guest). Se han propuesto diferentes modelos con distintas

estequiometrías, 2:1 **38** y 2:2 **39** (Figura 33). Un receptor o anfitrión en el que dos unidades de γ -ciclodextrina están unidas covalentemente por puentes -NH(CO)-CH₂-CH₂-(CO)NH- o -NH-CO-NH- permite estudiar el estado excitado de la curcumina contenida en su interior (135).

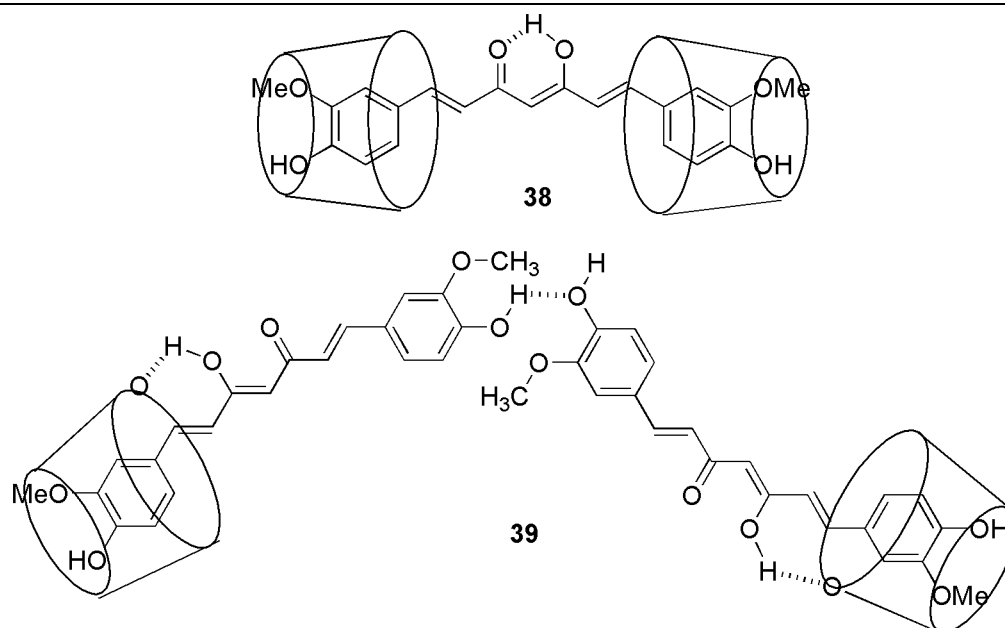


Figura 33. Complejos curcumina/ciclodextrinas.

El *p*-sulfonatocalix[4]arene ha sido utilizado como vector de la curcumina (136); también se han usado nanopartículas (137), con interesantes aplicaciones en Resonancia Magnética de Imagen (MRI).

d) Síntesis de derivados de curcumina con sustituyentes

ferrocenilo

En la Figura 34 hemos representado algunos de estos compuestos (138).

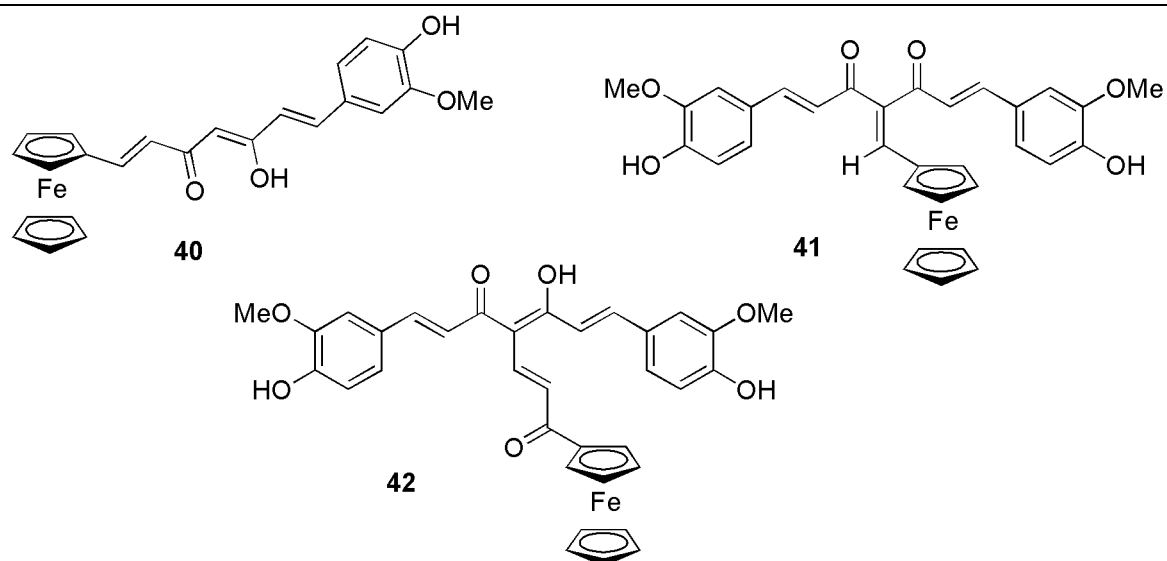


Figura 34. Ferrocenilcurcuminas.

6. SÍNTESIS DE HETEROCICLOS RELACIONADOS CON LA CURCUMINA

6.1. El heterociclo en una posición distal

6.1.1. Síntesis de fotosensibilizadores porfirínicos enlazados a la curcumina

Se trata de una nueva terapia anticancerosa no invasiva, basada en la activación fotosensibilizadora y la administración selectiva a tejidos mediante la formación de especies oxigenadas citotóxicas. Así se han preparado los compuestos **44** (a-d) a partir de **43** (Figura 35) (139).

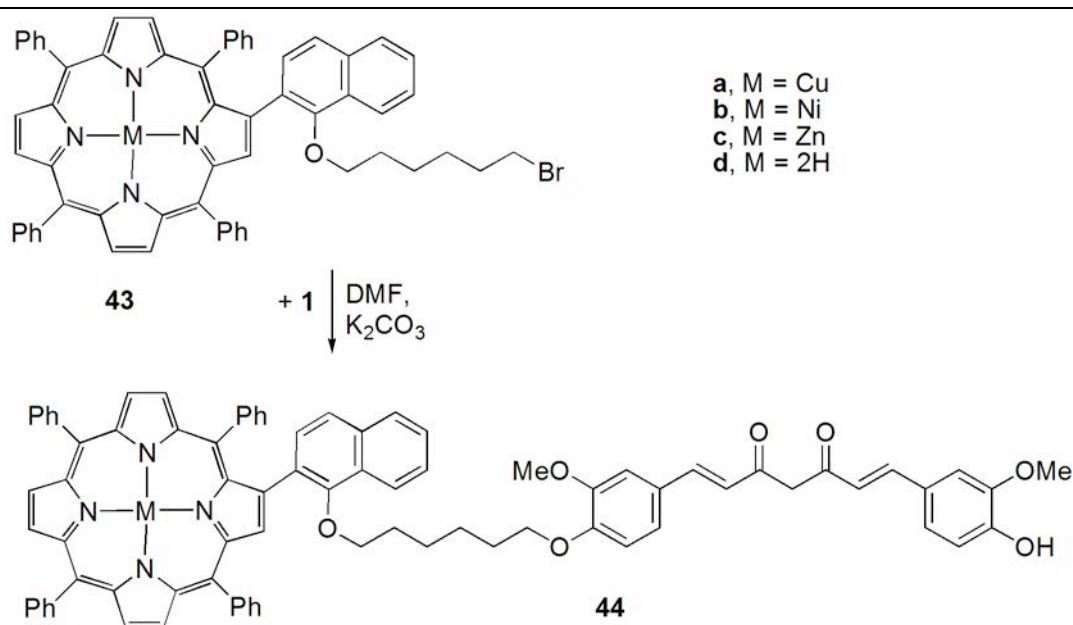


Figura 35. Curcuminoid porfirinas.

6.1.2. Un heterociclo en lugar de un fenilo

Tanto furanos como tiofenos, **45**, han sido estudiados como isómeros del fenilo de la curcumina (Figura 36) (140).

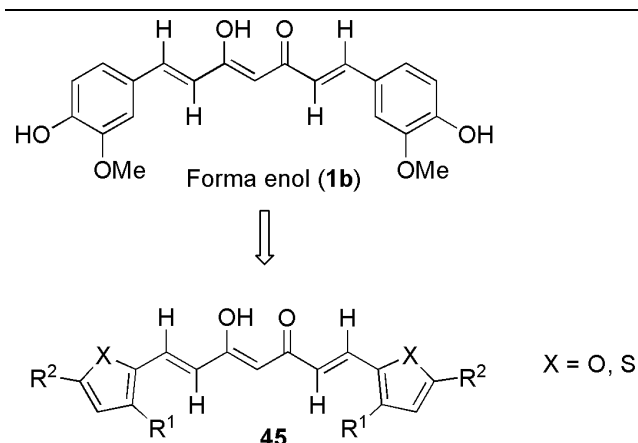


Figura 36. Análogos furánicos y tiofénicos de la curcumina.

6.2. El heterociclo en una posición intermedia

Muy poco frecuente, pues requiere bloquear la reactividad de la β -dicetona, se ha descrito un ejemplo representado en la Figura 37, donde se describe la preparación de los compuestos **46** (a-d) partiendo de **35e** (132). Hay que señalar que las 2-pirazolininas (4,5-dihidropirazoles) **46d** tienen centros estereogénicos en sus posiciones 5 y por lo tanto **46d** es una mezcla de diastereoisómeros, aunque los autores no lo señalan. Igual ocurre con **46b** y **46c**.

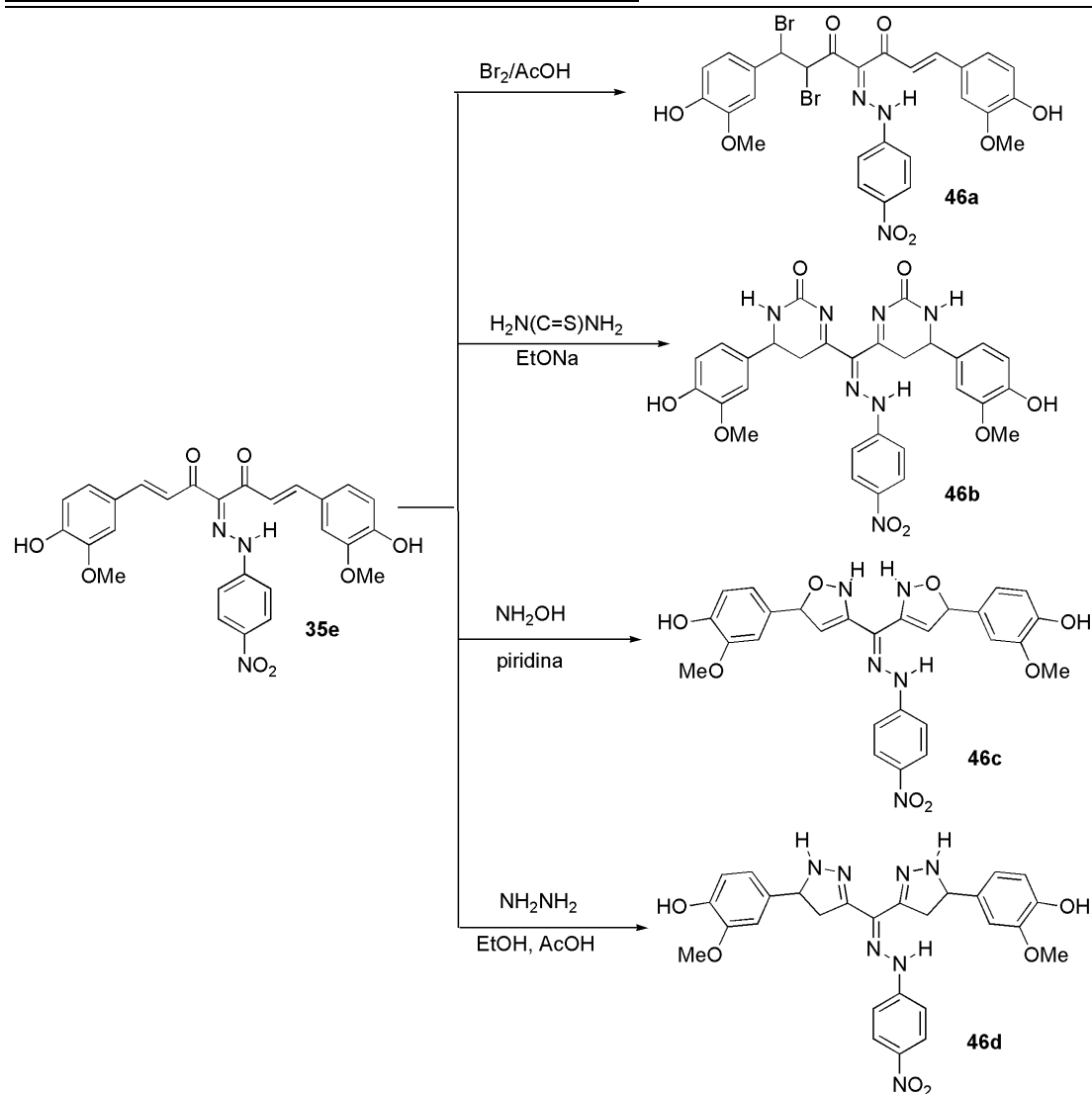


Figura 37. Derivados *p*-nitrofenilhidrazono de la curcumina.

6.3. El heterociclo en una posición central

6.3.1. Anillos de 5 eslabones

Uno de los heterociclos más utilizados es el pirazol,

pero como hemos escrito recientemente una revisión sobre pirazoles curcuminoides (149 derivados, 73 referencias) (141), remitimos al lector allí. Dado que muchos de estos pirazoles fueron preparados por reacción de la curcumina y

otras β -dicetonas curcuminoides con hidrazina, la mayoría de autores también prepararon los correspondientes isoxazoles usando hidroxilamina. En general, los isoxazoles resultaron menos activos que los pirazoles, y dicha línea de investigación está siendo abandonada; aún así, hay una publicación (142), citada en una revisión sobre las potenciales propiedades medicinales de los isoxazoles (143), donde sólo se describe el isoxazol derivado de la curcumina [el correspondiente pirazol es uno de los pirazoles curcuminoides más estudiados (141)]. Ningún isotiazol de tipo curcuminóide ha sido descrito hasta el presente, probablemente porque la

tiohidroxilamina es un reactivo muy inestable.

6.3.2. Anillos de 6 eslabones

Se han descrito tres pirimidinas preparadas a partir de la curcumina usando urea (**47**), guanidina (**48**) y tiourea (**49**) (Figura 38). Dichos compuestos muestran propiedades anticancerosas *in vitro*, el más interesante es **48**, muy activo frente a células HT29 (cáncer de colon) (144).

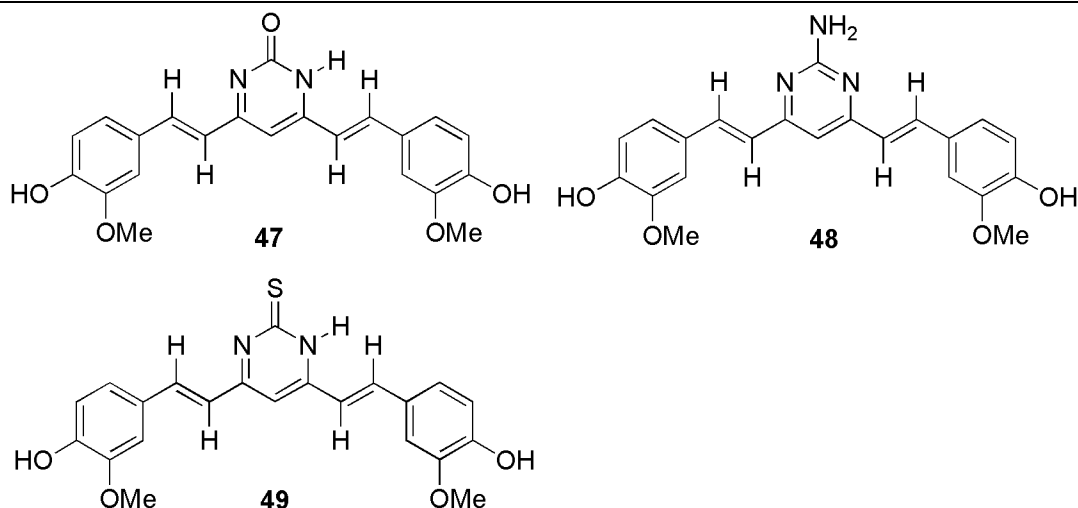


Figura 38. Pirimidinas derivadas de la curcumina.

6.3.3. Anillos de 7 eslabones

Una 3,6-dihidro-2*H*-1,4-diazepina **50** (Figura 39), ha sido preparada por reacción de la curcumina con etilendiamina y ensayada, sin éxito, frente a bacterias Gram-negativas, pero siendo más potente que la ampicilina

frente a *S. aureus* (145). Ninguna benzodiazepina, por ejemplo **51**, ha sido descrita; según ciertos autores (146) la reacción de la curcumina con *o*-fenilendiamina conduce al producto abierto de doble condensación **52** (Figura 39).

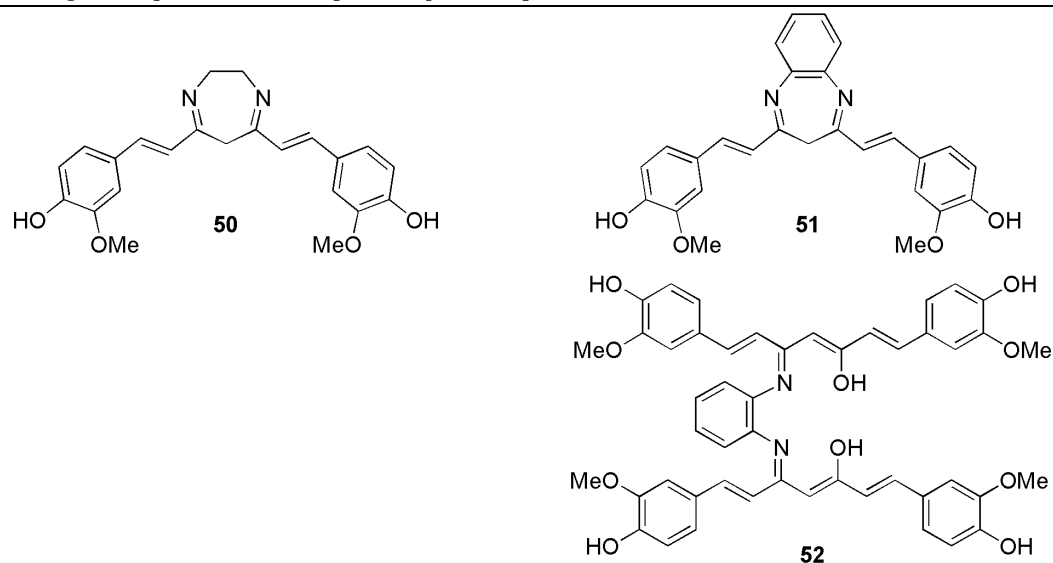


Figura 39. Diazepinas derivadas de la curcumina.

7. NUESTRA CONTRIBUCIÓN

Hemos dedicado tres trabajos a los curcuminoides y hemicurcuminoides (147-149). En el primero se ha llevado a cabo un estudio de la tautomería de compuestos β -dicarbonílicos, en especial de la curcumina (**1a/1b**) y de los hemicurcuminoides (un brazo tipo curcumina -estirilo- y el otro un metilo **53** o un fenilo **54**, Figura 40); para ello se ha usado la RMN de ^{13}C así como cálculos teóricos de desplazamientos químicos [GIAO/B3LYP/6-31G(d,p)] (147). El segundo versa sobre la tautomería de los

hemicurcuminoides **54** en disolución y en estado sólido por RMN, y también por cristalografía de rayos-X (148). Finalmente, en el último se ha extendido la estructura de los hemicurcuminoides a aquellos que tienen un grupo trifluorometilo **55** (y sustituyentes fluor en el anillo aromático) y se han llevado a cabo cálculos teóricos de sistemas periódicos (Quantum ESPRESSO) para interpretar los resultados de estado sólido (149). Nótese que en caso de los hemicurcuminoides hay dos tautómeros ceto-enol **b** y **c**.

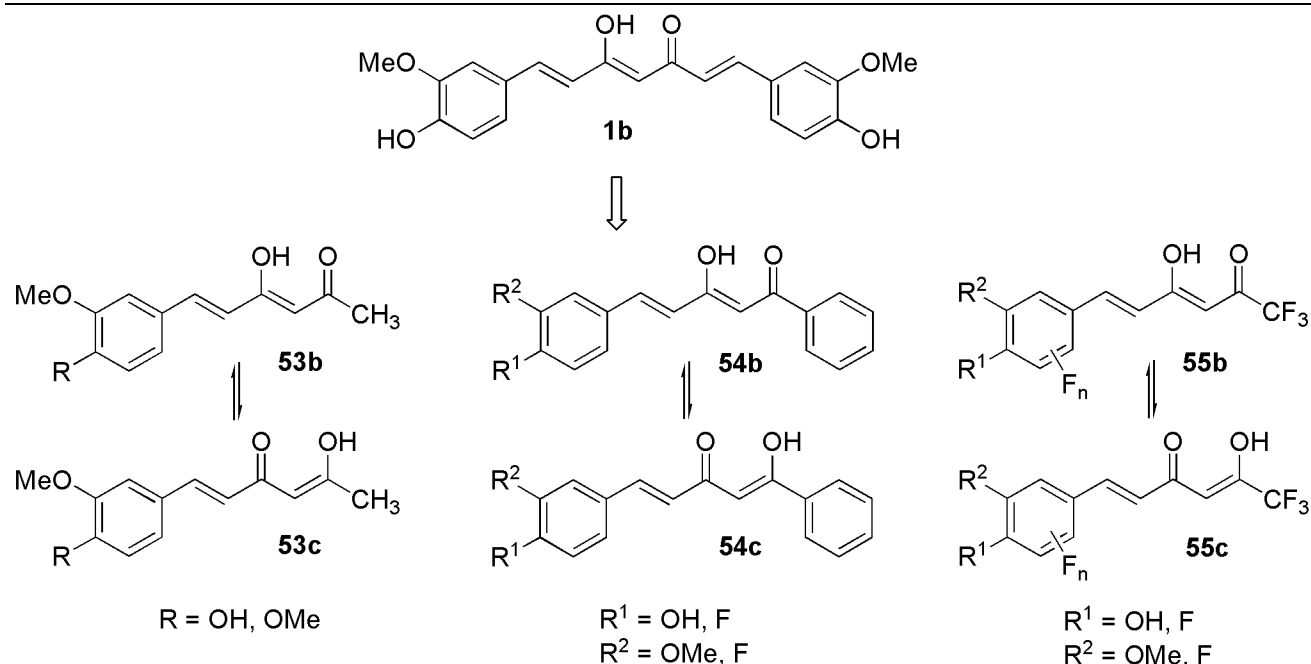


Figura 40. Hemicurcuminoides.

En la actualidad hemos iniciado la determinación del carácter antioxidante de las dicetonas hemicurcuminoides comparativamente con la curcumina, mediante su ensayo por los métodos FRAP, ABTS (ácido 2,2,azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6 sulfónico) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), con resultados satisfactorios. Se ha evaluado la citotoxicidad frente a la línea celular neuronal SH-SY5Y de neuroblastoma humano de las que han dado mejores resultados en los ensayos anteriores. Por último, se ha determinado el carácter neuroprotector como antioxidantes frente a dicha línea celular SH-SY5Y de aquellos compuestos que no presentan citotoxicidad (150).

8. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad, proyecto CTQ2014-56833-R titulado "Identificación de nuevos quimiotipos con propiedades antioxidantes: síntesis y aplicaciones en diferentes patologías", por la ayuda económica.

9. REFERENCIAS

- Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. Curcumin derived from Turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. In: Bagchi, D, Preuss, HG, Eds. *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. New York: CRC Press, 2005; pp. 349-87.
- Maheshwari RK, Singh, A. K, Gaddipati, J, Srimal, R. C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci* 2006; 78: 2081-7.
- Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur KS, Sundaram C, Seeram N, Shishodia S. *Curcumin - Biological and Medicinal Properties*. New York: CRC Press, 2007; 45: 297-369.
- The molecular targets and therapeutical uses of curcumin in health and disease. Aggarwal, BB, Surj, YJ, Shishodia, S. New York: Springer, 2007.
- Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 1590-1611.

6. Itokawa H, Shi Q, Toshiyuki A, Morris-Natschke S. L Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin Med* 2008; 3, 11: 1-13.
7. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin - From molecule to biological function. *Angew Chem Int*. 2012; 51: 5308-32.
8. Subash C, Sridevi P, Wonil K, Bharat BA. Discovery of curcumin, a component of the golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 283-99.
9. Bukhari SNA, Jantan IB, Jasamai M, Ahmad W, Amjad MWB. Synthesis and biological evaluation of curcumin analogues. *J Med Sci* 2013; 13: 501-13.
10. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol Adv* 2014; 32: 1053-64.
11. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Tan BKH, Kumar AP, Sethi G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules* 2015; 20: 2728-69.
12. Al-Suhaimi EA. Curcumin induces apoptosis of 3T3-L1 adipocytes and affects molecular signals of adiponectin, AMPK and PKA. *An Real Acad Farm* 2104; 80: 720-34.
13. Lin X, Ji S, Qiao X, Hu H, Chen N, Dong Y, Huang Y, Guo D, Tu P, Ye M. Density functional theory calculations in stereochemical determination of terpecurcumins J-W, cytotoxic terpene-conjugated curcuminoids from *Curcuma longa* L. *J Org Chem* 2013; 78: 11835-48.
14. Jirásek P, Amslinger S, Heilmann J. Synthesis of natural and non-natural curcuminoids and their neuroprotective activity against glutamate-induced oxidative stress in HT-22 cells. *J Nat Prod* 2014; 77: 2206-17.
15. Weng Q, Fu L, Chen G, Hui J, Song J, Feng J, Shi D, Cai Y, Ji J, Liang G. Design, synthesis, and anticancer evaluation of long-chain alkoxylated mono-carbonyl analogues of curcumin. *Eur J Med Chem* 2015; 103: 44-55.
16. Poorghorban M, Karoyo AH, Grochulski P, Verrall R. E, Wilson LD, Badea IA. ¹H NMR study of host/guest supramolecular complexes of a curcumin analogue with β -cyclodextrin and a β -cyclodextrin-conjugated gemini surfactant. *Mol Pharm* 2015; 12: 2993-3006.
17. Li Y, Zhang LP, Dai, F, Yan WJ, Wang HB, Tu ZS, Zhou B. Hexamethoxylated monocarbonyl analogues of curcumin cause G2/M cell cycle arrest in NCI-H460 cells via Michael acceptor-dependent redox intervention. *J Agr Food Chem* 2015; 63: 7731-42.
18. Jha A, Duffield KM, Ness MR, Ravoori S, Andrews G, Bhullar KS, Rupasinghe HPV, Balzarini J. Curcumin-inspired cytotoxic 3,5-bis(arylmethylene)-1-(*N*-(*ortho*-substitutedaryl)maleamoyl)-4-piperidones: a novel group of topoisomerase II α inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2015; 23: 6404-17.
19. Claramunt RM, López C, Lott S, Santa María MD, Alkorta I, Elguero J. Solid-state NMR study of the tautomerism of acetylacetone included in a host matrix. *Helv Chim Acta* 2005; 88: 1931-42.
20. Manolova Y, Deneva V, Antonov L, Drakalska E, Momekova D, Lambov N. The effect of water on the curcumin tautomerism. A quantitative approach. *Spectrochim Acta* 2014; Part A 132: 815-20.
21. González A, Marquet J, Moreno-Mañas M. Metal complexes in organic synthesis. Preparation of α -(1-adamantyl)- β -dicarbonyl compounds and 4-(1-adamantyl)-3,5-disubstituted pyrazoles and isoxazoles. *Tetrahedron* 1986; 42: 4253-7.
22. Moreno-Mañas M, Marquet J, Vallribera A. Transformations of β -dicarbonyl compounds by reactions of their transition metal complexes with carbon and oxygen derivatives. *Tetrahedron* 1996; 52: 3377-401.
23. Sundaryono A, Nourmamode A, Gardrat C, Fritsch A, Castellan A. Synthesis and complexation properties of two new curcuminoid molecules bearing a diphenylmethane linkage. *J Mol Struct* 2003; 649: 177-90.
24. Leung MHM, Pham DT, Lincoln SF, Kee TW. Femtosecond transient absorption spectroscopy of copper(II)-curcumin complexes. *Phys Chem Chem Phys* 2012; 14: 13580-7.
25. Aliaga-Alcalde N, Rodríguez L, Ferbinteanu M, Höfer P, Weyhermüller T. Crystal structure, fluorescence, and nanostructuration studies of the first Zn(II) anthracene-based curcuminoid. *Inorg Chem* 2012; 51: 864-73.
26. Su H, Sun F, Jia J, He H, Wang A, Zhu G. A highly porous medical metal-organic framework constructed from bioactive curcumin. *Chem Commun* 2015; 51: 5774-7.
27. Banerjee S, Chakravarty AR. Metal complexes of curcumin for cellular imaging, targeting, and photoinduced anticancer activity. *Acc Chem Res* 2015; 48: 2075-83.
28. (a) Fang J, Lu J, Holmgren A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin. *J Biol Chem* 2005; 280: 25284-90. (b) Fang J, Lu J, Holmgren A. Inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase by 4-hydroxy-2-nonenal in vitro and in vivo. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 1879-85.
29. Movassagh B, Shaygan P. Michael addition of thiols to α,β -unsaturated carbonyl compounds under solvent-free conditions. *Arkivoc* 2006; 12: 130-7.
30. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 62-9.
31. Marcu MG, Jung YJ, Lee S, Chung EJ, Lee MJ, Trepel J, Neckers L. Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med Chem* 2006; 2: 169-74.

32. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini KI, Aggarwal BB. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep* 2011; 28: 1937-55.
33. Gryniewicz G, Slifirski P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim Pol* 2012; 59: 201-12.
34. Ou JL, Mizushima Y, Wangm SY, Chuang DY, Nadar M, Hsu WL. Structure-activity relationship analysis of curcumin analogues on anti-influenza virus activity. *FEBS J* 2013; 1-12.
35. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules* 2014; 19: 20091-112.
36. Amolins MW, Peterson LB, Blagg BSJ. Synthesis and evaluation of electron-rich curcumin analogues. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 360-7.
37. Li W, Wu W, Yu F, Huang H, Liang X, Ye J. Catalytic asymmetric Michael addition with curcumin derivative. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 2505-11.
38. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 15: 1867-76.
39. Kumavat SD, Chaudhari YS, Borole P, Mishra P, Shenghani K, Duvvuri P. Degradation studies of curcumin. *Int J Pharm Rev Res* 2013; 3: 50-5.
40. Shen L, Ji HF. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol Med* 2012; 18: 138-44.
41. Schneider C, Gordon ON, Edwards RL, Luis PB. Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 7606-14.
42. Bai G, Yu C, Cheng C, Hao E, Wei E, Mu X, Jiao L. Syntheses and photophysical properties of BF₂ complexes of curcumin analogues. *Org Biomol Chem* 2014; 12: 1618-26.
43. Gordon ON, Schneider C. Vanillin and ferulic acid: not the major degradation products of curcumin. *Trends Mol Med* 2012; 18: 361-3.
44. Siddiqui NA. Evaluation of thermo sensitivity of curcumin and quantification of ferulic acid and vanillin as degradation products by a validated HPTLC method. *Pak J Pharm Sci* 2015; 28: 299-305.
45. Mishra MK, Sanphui P, Ramamurty U, Desiraju GR. Solubility-hardness correlation in molecular crystals: Curcumin and sulfathiazole polymorphs. *Cryst Growth Des* 2014; 14: 3054-61.
46. Galer P, Golobič A, Koller J, Košmrlj B, Šket B. Structures in solid state and solution of dimethoxy curcuminoids: regioselective bromination and chlorination. *Chem Cent J* 2013; 7, 107: 1-20.
47. Allen FH. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr Sect. B* 2002; 58: 38-388.
48. Tønnesen HH, Karlsen J, Mustard A. Structural studies of curcuminoids. I. Crystal structure of curcumin. *Acta Chem Scand* 1982; B 36: 475-9.
49. Parameswani AR, Devipriya B, Jennieffer SJ, Muthiah PT. Low temperature crystal structure of 5-hydroxy-1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-hepta-1,6-dien-3-one. *J Chem Crystallogr* 2012; 42: 227-31.
50. Sanphui P, Goud NR, Khandavilli UBR, Bhanoth S, Nangia A. New polymorphs of curcumin. *Chem Commun* 2011; 47: 5013-5.
51. Thorat AA, Dalvi SV. Solid-state phase transformations and storage stability of curcumin polymorphs. *Cryst Growth Des* 2015; 15: 1757-70.
52. Sanphui P, Goud NR, Khandavilli UBR, Nangia A. Fast dissolving curcumin cocrystals. *Cryst Growth Des* 2011; 11: 4135-45.
53. Chow SF, Shi L, Ng WW, Leung KHY, Nagapudi K, Sun CC, Chow AHL. Kinetic entrapment of a hidden curcumin cocrystal with phloroglucinol. *Cryst Growth Des* 2014; 14: 5079-89.
54. Balasubramanian K. Molecular orbital basis for yellow curry spice curcumin's prevention of Alzheimer's disease. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 3512-20.
55. Benassi R, Ferrari E, Lazzari S, Spagnolo F, Saladini M. Theoretical study of curcumin: a comparison of calculated spectroscopic properties with NMR, UV-vis and IR experimental data. *J Mol Struct* 2008; 892: 168-76.
56. (a) Pearson RG. Hard and soft acids and bases, HSAB, Part I. Fundamental principles. *J Chem Educ* 1968; 45: 581-6. (b) Pearson RG. Hard and soft acids and bases, HSAB, Part II. Underlying theories. *J Chem Educ* 1968; 45: 643-8.
57. Janaki N, Bose JL. An improved method for the isolation of curcumin from turmeric (*Curcuma longa* L.). *J Indian Chem Soc* 1967; 44: 985-6.
58. Reverchon E, De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J Supercrit Fluids* 2006; 38: 146-66.
59. Baumann W, Rodrigues SV, Viana LM. Pigments and their solubility in extractability by supercritical CO₂. I. The case of curcumin. *Braz J Chem Eng* 2000; 17: 323-8.
60. Dandekar DV, Gaikar VG. Microwave assisted extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Separ Sci Technol* 2002; 37: 2669-90.
61. Zaila F, Bikadi Z, Simonyi M. Circular dichroism spectroscopic studies reveal pH dependent binding of curcumin in the minor groove of natural and synthetic nucleic acids. *Org Biomol Chem* 2004; 2: 2902-10.
62. Patra D, Barakat C. Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye. *Spectrochim Acta Part A* 2011; 79: 1034-41.
63. Barry J, Fritz M, Brender J, Smith P, Lee D, Ramamoorthy A. Determining the effects of lipophilic

- drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy - The case of the antioxidant curcumin. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 4490-8.
64. Qin NY, Yang FQ, Wang YT, Li SP. Quantitative determination of eight components in rhizome (Jianghuang) and tuberous root (Yujin) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed* 2007; 43: 486-92.
65. Tanaka K, Kuba Y, Sasaki T, Hiwatashi F, Komatsu K. Quantitation of curcuminoids in curcuma Rhizome by near-infrared spectroscopic analysis. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 8787-92.
66. Péret-Almeida L, Cherubino APF, Alves RJ, Dufossé L, Glória MBA. Separation and determination of the physicochemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Res Int* 2005; 38: 1029-44.
67. Song W, Qiao X, Liang WF, Ji S, Yang L, Wang Y, Xu YW, Yang Y, Guo DA, Ye M. Efficient separation of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from tumeric using supercritical fluid chromatography: From analytical to preparative scale. *J. Sep. Sci.* 38, 3450-3453 (2015).
68. Dhar G, Chakravarty D, Hazra J, Dhar J, Poddar A, Pal M, Chakrabarti P, Surolia A, Bhattachayya B. Actin-curcumin interaction: insights into the mechanism of actin polymerization inhibition. *Biochem* 2015; 54: 1132-43.
69. Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD, Hill KA, Williams ML, Leuratti C, Manson MM, Marnett LJ, Steward WP, Gescher A. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. *Clin. Cancer Res* 2001; 7: 1452-8.
70. Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orlowski RZ. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 3868-75.
71. Füllbeck M, Huang X, Dumdey R, Frommel C, Dubiel W, Preissner R. Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by *in silico* 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. *BMC Cancer* 2005; 5, 97: 1-14.
72. Siwak DR, Shishodia S, Aggarwal BB, Kurzrock R. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I κ B kinase and nuclear factor κ B activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. *Cancer* 2005; 104: 879-90.
73. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur. J. Cancer* 2005; 41: 1955-68.
74. Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev* 2006; 66: 222-307.
75. Shishodia S, Chaturvedi M, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer* 2007; 31: 243-305.
76. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division* 2008; 3: 1-14.
77. Teiten MH, Gaascht F, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr* 2010; 5: 61-74.
78. Banerjee S, Prasad P, Hussain A, Khan I, Kondaiah P, Chakravarty AR. Remarkable phototoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium (IV) complex formation. *Chem Commun* 2012; 48: 7702-4.
79. Caldarelli A, Penucchini E, Caprioglio D, Genazzani AA, Minassi A. Synthesis and tubulin-binding properties of non-symmetrical click C5-curcuminoids. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 5510-7.
80. Liu K, Zhang D, Chojnacki J, Du Y, Fu H, Grant S, Zhang S. Design and biological characterization of hybrid compounds of curcumin and thalidomide for multiple myeloma. *Org Biomol Chem* 2013; 11: 4757-63.
81. Yang C, Wang Z, Ou C, Chen M, Wang L, Yang Z. A supramolecular hydrogelator of curcumin. *Chem Commun* 2014; 50: 9413-5.
82. Fiala M. Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon- γ production: benefits of omega-3 with curcumin against cancer. *Molecules* 2015; 20: 3020-6.
83. Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G₂ phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biochem Chem* 2005; 280: 20059-68.
84. Liu Z, Du ZY, Huand ZS, Lee KS, Gu LQ. Inhibition of thioredoxin reductase by curcumin analogs. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 2214-8.
85. Cai W, Zhang B, Duan D, Wu J, Fang J. Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 262: 341-8.
86. Singh DV, Misra K. Curcuminoids as inhibitors of thioredoxin reductase: a receptor based pharmacophore study with distance mapping of the active site. *Bioinformation* 2009; 24: 187-92.
87. Chen J, Li L, Su J, Li B, Zhang X, Chen T. Proteomic analysis of G2/M arrest triggered by natural borneol/curcumin in HepG2 cells, the importance of the reactive oxygen species-p53 pathway. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 6440-9.
88. Keslacy S, Vallano ML. Targeting NF- κ B inflammatory and prosurvival signalling in

- Alzheimer's disease. Chapter 21, 129-152. Kennedy, D. O, Wightman, E. L, Okello, E. J. Medicinal plants, phytochemicals and Alzheimer's disease. Chapter 27, 269-290, in *Emerging drugs and targets for Alzheimer's disease; Volume 2: Neuronal plasticity, neuronal protection and other miscellaneous strategies*. Ed. A. Martínez. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.
89. Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 196-208.
 90. Wolf LK. Turmeric-derived compound curcumin may treat Alzheimer's. *Chem Eng News* 2012; 90: 44-6.
 91. Park SY, Kim HS, Cho EK, Kwon BY, Phark S, Hwang KW, Sul D. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2881-7.
 92. McCrate OA, Zhou X, Cegelski L. Curcumin as an amyloid-indicator dye in *E. Coli*. *Chem Commun* 2013; 49: 4193-5.
 93. Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Morimoto H, Yoshida Y, Maekawa T, Venugopal K, Kumar DS. Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 Peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 2012; 7, e32616: 1-10.
 94. Chojnacki JE, Liu K, Yan X, Toldo S, Selden T, Estrada M, Rodríguez-Franco MI, Halquist MS, Ye D, Zhang S. Discovery of 5-(4-hydroxyphenyl)-3-oxopentanoic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide as a neuroprotectant for Alzheimer's disease by hybridization of curcumin and melatonin. *ACS Chem Neurosci* 2014; 5: 690-9.
 95. Fang L, Gou S, Liu X, Cao F, Cheng L. Design, synthesis and anti-Alzheimer properties of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24: 40-3.
 96. Prior M, Dargusch R, Ehren JL, Chiruta C, Schubert D. The neurotrophic compound J147 reverses cognitive impairment in aged Alzheimer's disease mice. *Alzheimer's Res Ther* 2013; 5: 25, 1-19.
 97. Mayadevi M, Sherin DR, Keerthi VS, Rajasekharan KN, Omkumar RV. Curcumin is an inhibitor of calcium/calmodulin dependent protein kinase II. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 6040-7.
 98. Park K, Seo Y, Kim MK, Kim K, Kim YK, Choo H, Chong Y. A curcumin-based molecular probe for near-infrared fluorescence imaging of tau fibrils in Alzheimer's disease. *Org Biomol Chem* 2015; 13: 11194-9.
 99. Vajragupta O, Boonchoong P, Morris GM, Olson AJ. Active site binding modes of curcumin in HIV-1 protease and integrase. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 3364-8.
 100. Mazumder A, Raghavan K, Weinstein J, Kohn KW, Pommier Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1165-70.
 101. Mazumder A, Neamati N, Sunder S, Schulz J, Pertz H, Eich E, Pommier Y. Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J Med Chem* 1997; 40: 3057-63.
 102. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Rev* 2005; 4: 236-48.
 103. Cohly HHP, Asad S, Das SK, Angel MF, Rao M. Effect of antioxidant (turmeric, turmerin, curcumin) on human immunodeficiency virus. *Int J Mol Sci* 2003; 4: 22-33.
 104. Gao X, Kuo J, Jiang H, Deeb D, Liu Y, Divine G, Chapman RA, Dulchavsky SA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 51-61.
 105. Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Ahn SC, Park YC, Park YM. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF- κ B as potential targets. *J Immunol* 2005; 174: 8116-24.
 106. Jakopin Z. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: a rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J Med Chem* 2014; 57: 6897-918.
 107. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J Biol Chem* 1995; 270: 24995-25000.
 108. Bhullar KS, Jha A, Youssef D, Rupasinghe HPV. Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. *Molecules* 2013; 18: 5389-404.
 109. Slavova-Kazakova AK, Angelova SE, Veprintsev TL, Denev P, Fabbri D, Dettori MA, Kratchanova M, Naumov VV, Trofimov AV, Vasil'ev RF, Delogu G. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J Org Chem* 2015; 11: 1398-411.
 110. Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG. H-Atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 9677-81.
 111. Kong L, Priyadarsini KI, Zhang HY. A theoretical investigation on intramolecular hydrogen-atom

- transfer in curcumin. *J Mol Struct Theochem* 2004; 685: 111-6.
112. Masuda T, Hidaka K, Shinohara A, Maekawa T, Takeda Y, Yamaguchi H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 71-7.
113. Weber WM, Hunsaker LA, Abcouwer SF, Deck LM, Vander Jagt DL. Antioxidant activities of curcumin and related enones. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 3811-20.
114. Cao YK, Li HJ, Song ZF, Li Y, Huai QY. Synthesis and biological evaluation of novel curcuminoid derivatives. *Molecules* 2014; 19: 16349-72.
115. Jayaprakasha GK, Rao LJ, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem* 2006; 98: 720-4.
116. Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- γ activation. *PPAR Res* 2007; 89369: 1-5.
117. Seely KA, Levi MS, Prather PL. The dietary polyphenols *trans*-resveratrol and curcumin selectively bind human CB1 cannabinoid receptors with nanomolar affinities and function as antagonists/inverse agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 330: 31-9.
118. Kuhad A, Pilkhwai S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10150-5.
119. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 533-40.
120. Chan MMY, Huang HI, Fenton MR, Fong D. *In vivo* inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1955-62.
121. Onoda M, Inano H. Effect of curcumin on the production of nitric oxide by cultured rat mammary gland. *Nitric Oxide* 2000; 4: 505-15.
122. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-68.
123. Inano H, Onoda M. Role of nitric oxide in radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Nitric Oxide* 2003; 8: 144-8.
124. Chen J, Tang XQ, Zhi JL, Cui Y, Yu HM, Tang EH, Sun SN, Feng JQ, Chen PX. Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. *Apoptosis* 2006; 11: 943-53.
125. Braidy N, Grant R, Adams S, Guillemin GJ. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J* 2010; 277: 368-82.
126. Yu SY, Zhang M, Luo J, Zhang L, Li G. Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2013; 45: 47-53.
127. Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glöckner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL, Caplan MJ. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 2004; 304: 600-2.
128. Pabon HJJ. A synthesis of curcumin and related compounds. *Rec Trav Chim Pays-Bas* 1964; 83: 379-86.
129. Gadad BSG, Subramanya PK, Pullabhatla S, Shantharam IS, Rao KS. Curcumin-glucoside, a novel synthetic derivative of curcumin, inhibits α -synuclein oligomer formation: relevance to Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 76-84.
130. Arezzini B, Ferrali M, Ferrari E, Grandi R, Monti S, Saladini M. Glycosyl-curcuminoids as potential new chelating agents in iron overload chelation therapy. *Eur J Inorg Chem* 2004; 646-52.
131. Nabati M, Mahkam M. Synthesis and characterization of novel silyl derivatives of curcumin. *Iran Chem Commun* 2014; 2: 129-36.
132. Fadda AA, Badria FA, El-Attar KM. Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. *Med Chem Res* 2010; 19: 413-30.
133. Nichols CE, Youssef D, Harris RG, Jha A. Microwave-assisted synthesis of curcumin analogs. *Arkivoc* 2006; 13: 64-72.
134. (a) Tønnesen HH, Måsson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 2002; 244: 127-35. (b) Yadav VR, Suresk S, Devi K, Yadav S. Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and antiinflammatory activity in rat colitis model. *AAPS PharmSciTech* 2009; 10: 752-62. (c) Yadav VR, Prasad S, Kannappan R, Ravindran J, Chaturved MM, Vaahtera L, Parkkinen J, Aggarwal BB. cyclodextrin-complexed curcumin exhibits antiinflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1021-32. (d) Mohan PRK, Sreelakshmi G, Muraleedharan CV, Joseph R. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2012; 62: 77-84. (e) Rachmawati H, Edityaningrum CA, Mauludin R. Molecular inclusion complex of curcumin- β -cyclodextrin nanoparticle to

- enhance curcumin skin permeability from hydrophilic matrix gel. *AAPS PharmSciTech* 2013; 14: 1303-12.
- (f) Radjaram A, Hafid AF, Setyawan D. Dissolution enhancement of curcumin by hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5: 401-5.
- (g) Mangolim CS, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Neto AM, Matioli G. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem* 2014; 153: 361-70.
- (h) Jantararat C, Sirathanarun P, Ratanapongsai S, Watcharakan P, Sunyapong S, Wadu A. Curcumin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex preparation methods: effect of common solvent evaporation, freeze drying, and pH shift on solubility and stability of curcumin. *Trop J Pharm Res* 2014; 13: 1215-23.
- (i) Kongprathet T, Wanichwecharungruang S. Sustaining guest molecules on bio-surfaces by grafting the surfaces with cyclodextrins. *Carbohydrate Pol* 2015; 119: 110-7.
135. Harada T, McTernan HL, Pham DT, Lincoln SF, Kee TW. Femtosecond transient absorption spectroscopy of the medicinal agent curcumin in diamide linked γ -cyclodextrin dimers. *J Phys Chem* 2015; B 119: 2425-33.
136. Mareeswaran PM, Babu E, Sathish V, Kim B, Woo SI, Rajagopal S. *p*-Sulfonatocalix[4]arene as a carrier for curcumin. *New J Chem* 2014; 38: 1336-45.
137. Magro M, Campos R, Baratella D, Lima G, Holà K, Divoky C, Stollberger R, Malina O, Aparicio C, Zoppellaro G, Zboril R, Vianello F. A magnetically drivable nanovehicle for curcumin with antioxidant capacity and MRI relaxation properties. *Chem Eur J* 2014; 20: 11913-20.
138. (a) Arezki A, Brulé E, Jaouen G. Synthesis of the First Ferrocenyl Derivatives of Curcuminoids. *Organometallics* 2009; 39: 1606-9. (b) Li PZ, Liu ZQ. Ferrocenyl-substituted curcumin: can it influence antioxidant ability to protect DNA? *Eur J Med Chem* 2011; 46: 1821-6. (c) Arezki A, Chabot G, Quentin L, Scherman D, Jaouen G, Brulé E. Synthesis and biological evaluation of novel ferrocenyl curcuminoid derivatives. *Med Chem Comm* 2011; 2: 190-5.
139. Huang QM, Wang SW, Li Q, Pan W, Deng PX, Zhou H, Pan ZQ. Synthesis and characterization of curcumin bridged porphyrins as photosensitizers. *Chem J Chin Univ* 2012; 33: 732-7.
140. Khan MA, El-Khatib R, Rainsford KD, Whitehouse MW. Synthesis and antiinflammatory properties of some aromatic and heterocyclic aromatic curcuminoids. *Bioorg Chem* 2012; 40: 30-8.
141. Claramunt RM, Nieto CI, Sanz D, Elguero J. Curcumin derived pyrazoles and related compounds. *Afinidad* 2015; [enviado para su publicación].
142. Poma P, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Maurici A, Carina V, Alaimo A, Rizzi M, Simoni D, D'Alessandro N. The antitumor activities of curcumin and of its isoxazole analogue are not affected by multiple gene expression changes in an MDR model of the MCF-7 breast cancer cell line: Analysis of the possible molecular basis. *Int J Mol Med* 2007; 20: 329-35.
143. Kumar KA, Jayaroopa P. Isoxazoles: molecules with potential medicinal properties. *Int J Pharm Chem Biol Sci* 2013; 3: 294-304.
144. Ahsan MJ, Khalilullah H, Yasmin S, Jadav SS, Govindasamy J. Synthesis, characterisation, and *in vitro* anticancer activity of curcumin analogues bearing pyrazole/pyrimidine ring targeting EGFR tyrosine kinase. *Bio Med Res Int* 2013; 239354: 1-14.
145. Hamed OA, Mehdawi N, Taha AA, Hamed EM, Al-Nuri MA, Hussein AS. Synthesis and antibacterial activity of novel curcumin derivatives containing heterocyclic moiety. *Iran J Pharm Res* 2013; 12: 47-56.
146. Sundarananthavalli S, Kulandaisamy A, Christopher CC. Synthesis, characterization, analgesic, anti-inflammatory, anti-ulcer, wound healing and antimicrobial effects of curcuminoids. *Int J ChemTech Res* 2011; 3: 2040-6.
147. Cornago P, Claramunt RM, Bouissane L, Alkorta I, Elguero J. A study of the tautomerism of β -dicarbonyl compounds with special emphasis on curcuminoids. *Tetrahedron* 2008; 64: 8089-94.
148. Cornago P, Cabildo P, Sanz D, Claramunt RM, Torralba MC, Torres MR, Elguero J. Structures of hemicurcuminoids in the solid state and in solution. *Eur J Org Chem* 2013; 6043-54.
149. Nieto CI, Cabildo P, Claramunt RM, Cornago P, Sanz D, Torralba MC, Torres MR, Ferraro M, Alkorta I, Elguero J. The structure of β -diketones related to curcumin determined by X-ray crystallography, NMR (solution and solid state) and theoretical calculations. *Struct Chem* 2015; DOI: 10.1007/s11224-015-0704-7.
150. Sánchez Alegre YR. Determinación *in vitro* del carácter antioxidante y neuroprotector de nuevas dicetonas aromáticas antioxidantes en condiciones de estrés oxidativo. Trabajo Fin de Máster. Proyecto de Investigación, Máster en Ciencia y Tecnología Química, UNED, Septiembre 2015.



Chronicle of Spanish constitutional pharmacy: 1978-2013

Title in Spanish: *Crónica amable de la Farmacia en la España constitucional: 1978-2013*

Enrique Granda Vega^{1,*}

¹Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

ABSTRACT: For many, the first thirty-five years after the adoption of the Spanish Constitution of 1978, are a time too close to address its historical study: it is in our mind marked by experiences and evocative images; He has formed our own lives, and so we tend to believe that, with minimal effort would be able to remember most of what happened. However, sometimes we would have taken note of many events that we have experienced, and become darker over time, which is intended to revitalize in this story. Pharmacy, in recent years has experienced very strong hand changes the political evolution of our country and the extraordinary scientific development. Great events are already being carved by the chisel of history, but there are other small issues that have concerned us that have moved us or produced curiosity: are the little story, Unamuno main "inside story" of the pharmacy, the subject of this work, to which the adjective "nice" it gets, because nothing fundamental has been lost in the pharmacy understood as a scientific art, defined as the King Felipe IV.

RESUMEN: Para muchos, los primeros treinta y cinco años después de la aprobación de la Constitución Española de 1978, son un periodo demasiado próximo para abordar su estudio histórico: está en nuestra mente marcado con vivencias e imágenes sugerentes; ha conformado nuestra propia vida, y por ello tendemos a considerar que, con un mínimo esfuerzo seríamos capaces de recordar casi todo lo sucedido. Sin embargo, en ocasiones desearíamos haber tomado nota de muchos acontecimientos que hemos vivido, y que se van oscureciendo con el paso del tiempo, algo que se pretende revitalizar en esta crónica. La Farmacia, en estos años ha vivido cambios muy intensos de mano de la evolución política de nuestro país y del extraordinario desarrollo científico. Los grandes acontecimientos ya están siendo tallados por el cincel de la historia, pero hay otras pequeñas cuestiones que nos han interesado, que nos han conmovido o producido curiosidad: son la pequeña historia, la unamuniana "intrahistoria" de la Farmacia, objeto principal de este trabajo, a las que se pone el adjetivo de "amables", porque nada fundamental se ha perdido en la Farmacia entendida como arte científico, tal como la definiera el Rey Don Felipe IV.

*Corresponding Author: egranda@congreso.es

Received: November 21, 2015 Accepted: December 14, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 311-318

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Para muchos, el período que media entre la aprobación de la Constitución Española de 1978 y el momento actual, es demasiado próximo para abordar su estudio histórico: está en nuestra mente, marcado con vivencias e imágenes sugerentes, ha conformado nuestra propia vida y, por ello, tendemos a considerar que, con un mínimo esfuerzo, seríamos capaces de recordar casi todo lo sucedido. Sin embargo, no es así.

La Farmacia, en estos años, ha vivido cambios muy intensos de mano del extraordinario desarrollo científico y de la evolución política de nuestro país.

Los grandes acontecimientos ya están siendo tallados por el cincel de la historia, pero hay otras pequeñas cuestiones que se han quedado en los márgenes de la memoria, aunque en su momento nos interesaron, nos conmovieron o simplemente sentimos curiosidad: son la pequeña historia de la Farmacia, su unamuniana *intrahistoria*, con sus personajes que también merecen ser recordados; y sucesos que difícilmente encontrarán un

hueco en los anales de esta época.

A ellos quiero dedicar también estas crónicas, a las que he puesto el adjetivo de *amables*, porque nada fundamental se ha perdido en la Farmacia entendida como arte científico, tal como la definiera el Rey Don Felipe IV (1), a excepción, eso sí, de algunos grandes amigos que nos han dejado en estos años y a los que también quiero rendir emocionado homenaje de admiración y cariño.

2. LOS PRIMEROS AÑOS DE LA TRANSICIÓN

Un humorista dijo a finales de los años 70 aquello de *"No solo hacemos la transición política, sino que además no se acaba nunca"*. Esta era la sensación que se tenía tras tres años de democracia vacilante y antes de conocerse los resultados concluyentes del referéndum constitucional.

Había crisis en la industria, que se arrastraba tras cuatro años de encarecimiento de las materias primas por aumento de los productos petrolíferos... y crisis en la oficina de farmacia por el sofisticado sistema de control implantado entonces por la Seguridad Social y por los efectos de la aportación variable que se denominó R-64;

por el aumento de la aportación de los beneficiarios y el despojo de las competencias tradicionales en alimentación ejercidas hasta entonces por los farmacéuticos titulares.

Pero lo que caracteriza más claramente el período de los primeros años tras la aprobación de la Constitución, es una inflación galopante que alcanza cotas desconocidas en nuestro país, afectando seriamente al sector farmacéutico, cuyo control de precios y márgenes le sitúa fuera de cualquier rentabilidad.

De aquel período hay que recordar las deudas a las farmacias por el Insalud y la persecución de un fenómeno al que coloquialmente se denominaba “tarugo”; el fin del R-64; la negativa a dispensar medicamentos poco novedosos; las revisiones de precios con trascendencia política y las polémicas sobre los Conciertos de la prestación farmacéutica.

Uno de los decretos publicados en 1978 (2) sembró el pánico entre los pequeños laboratorios que habían abusado de algunas prácticas poco éticas – el famoso *tarugo* consistente en pagar a los médicos – y que habrían de desaparecer en los años siguientes.

Por entonces se acuñó la frase de que “*había que ayudarles a bien morir*” pero no fue el decreto la causa principal de la desaparición de esos laboratorios, sino más bien las revisiones de precios insuficientes, las restricciones en el registro y los aumentos de costes.

Algunos conflictos crónicos tuvieron no obstante solución, como el que venía enfrentando a los farmacéuticos con los ópticos desde veinte años atrás, que pudo liquidarse honrosamente para ambas partes creando las escuelas de óptica de Santiago y Barcelona.

Aunque la publicación efectiva en el BOE fue en los primeros días de 1982, puede decirse que las Navidades farmacéuticas de 1981 fueron un poco más felices debido a la desaparición de uno de los factores más injustos que ha soportado, hasta ahora, la economía de la oficina de farmacia.

El R-64 era un factor de reducción del margen profesional en función del precio del medicamento que fue desarrollado por una orden ministerial firmada por Camilo Alonso Vega en el año 1964.

Entre los hechos de más difícil comprensión, con la perspectiva del transcurso de los años, se encuentra la actitud de algunos colegios de farmacéuticos relacionada con la no dispensación de especialidades repetitivas, tal como se reflejó en la prensa.

Si entonces no se comprendía, los tiempos han hecho que la situación se repita ahora con la multiplicidad de medicamentos genéricos, dando la razón a quienes iniciaron este camino hace muchos años; y lo que subyace en el fondo es un derecho de sustitución insatisfecho, entonces y ahora.

La revisión de precios de los medicamentos de 1981 constituye un paradigma de intrigas de carácter técnico/político, cuya historia merece ser contada y analizada con la perspectiva del tiempo.

En Sanidad permanece González Oti y ejecuta una de sus más brillantes actuaciones al poner fin al R-64, liberalizar el precio de las especialidades publicitarias, y llevar a cabo los preparativos para que puedan reglamentarse las especializaciones en farmacia.

Al final los problemas sanitarios derivados de la intoxicación con aceite de colza oscurecen la guerra farmacéutica y son los que fuerzan un cambio ministerial.

En 1982 era tan probable la victoria socialista en unas próximas elecciones generales que, por todos los medios, se quiso firmar el Concierto por parte de la Corporación Farmacéutica de modo que abarcase los cinco años siguientes; es decir, superase la próxima legislatura.

Las prisas en conseguir la firma del Concierto indignaron a la inspección del Insalud que acusaron a los negociadores de connivencia con la Corporación Farmacéutica, algo que se sustanció expedientando (3) al jefe de la inspección Francisco Pulido que en pocos meses, tras la victoria socialista, vería archivado su expediente.

Tanto el concierto con la Industria Farmacéutica, que no pudo volver a firmarse desde nuestra entrada en la Unión Europea porque infringía las normas de la Competencia, como con la Corporación, fueron motivo de intensas polémicas.

La lucha por el poder fue la característica de aquellos años en que UCD se deshacía en disensiones internas, y en los que el PSOE puso en juego toda su estrategia para acceder al poder.

En el campo sanitario se libró una importante batalla y la Farmacia fue uno de sus frentes más conflictivos, con interpelaciones constantes al Gobierno sobre especialidades farmacéuticas o incluso sobre las agujas hipodérmicas que compró el Insalud sin cumplir los requisitos de un Decreto sobre material Estéril.

3. TRAS LA VICTORIA SOCIALISTA DE 1983

Con eficacia, no exenta de algún lógico revanchismo, comienza a gobernar la Sanidad el partido socialista que había alcanzado la mayoría absoluta en las elecciones, del mes de octubre de 1982.

El sector farmacéutico mide entonces sus fuerzas y actúa con extraordinaria prudencia en la primera parte del año 1983, elaborando informes jurídicos y oponiendo la legalidad vigente, siempre que puede; argumento éste al que parecen sensibles las personas que rigen la nueva administración.

Pero el temor a desarrollos legislativos de carácter nacionalizador lo preside todo, y durante ese primer año de legislatura se producen actuaciones difícilmente repetibles, como el presupuesto individualizado de recetas para los médicos.

El resultado fue que el consumo de recetas cayó en más de 25 millones, pero la reacción de la Organización Médica Colegial no se hizo esperar y se inició una de las batallas dialécticas en la prensa más fuertes que se conocen en el sector sanitario entre el portavoz de Alianza Popular, Ramiro Rivera (4) y los responsables del Insalud

(5).

El Sindicato Libre de Farmacéuticos de Valencia había promovido un recurso ante los tribunales por el que se reclamaba el derecho a la libre apertura de farmacias, basándose en el texto constitucional que establece el libre ejercicio de las profesiones tituladas.

Algunos farmacéuticos pensaron que había llegado el momento de abrir una farmacia por un procedimiento rápido – y sobre todo barato – y recurrieron a los tribunales de justicia.

El Tribunal Superior de Justicia de Valencia se vio en un aprieto y recurrió al Tribunal Constitucional, que en relativo poco tiempo, emitió una sentencia salomónica declarando constitucional la Ley de Bases de Sanidad Nacional de 1944 en lo que se refiere a la apertura de farmacias, en tanto no se regulase por otra Ley votada en Cortes.

A partir del mes de febrero de 1985 se conoce el borrador de la Ley del Medicamento en el que había trabajado una comisión de expertos desde el año 1983.

El profesor Ramón Jordi González dejó de asistir a las reuniones de la comisión redactora a partir de 1984 por motivos de conciencia al ver el derrotero que tomaban los acontecimientos en relación con la oficina de farmacia (6).

Cuando en marzo de 1985 se edita el borrador y se envía a trámite de información pública estalla la tormenta y el clamor de los farmacéuticos llega al máximo.

En aquel momento se movilizó toda la prensa con editoriales y artículos, se convocaron asambleas y como medida testimonial se llevó a cabo una huelga a la japonesa –es decir trabajando más– el día 11 de julio.

Tras la huelga y la campaña mediática (7), la Administración probablemente solo pensó en infligir un castigo a los farmacéuticos, así como suena, y se dispuso a bajar los márgenes con argumentos improvisados y huecos, mediante una Orden Ministerial que sería inmediatamente recurrida.

En 1986 se aprueba también la Ley General de Sanidad, que acapara importantes críticas de distintos sectores. Sin embargo el Título V que se refiere a los productos farmacéuticos, no puede calificarse negativamente para el modelo de oficina de farmacia diseñado desde la Ley de Bases de Sanidad Nacional de 1944, ya que mantiene la propiedad en manos farmacéuticas y define a las oficinas de farmacia como establecimientos sanitarios sometidos a planificación.

Para sorpresa de muchos, el día 6 de marzo de 1986 el juzgado de Primera Instancia número 2, de San Sebastián dicta una sentencia favorable al Colegio de Farmacéuticos de Guipúzcoa y a la Asociación de Empresarios, en la demanda interpuesta contra la orden ministerial por que se reducía el margen de las farmacias.

Según la sentencia, *“la Administración deberá abstenerse de realizar actos que perturben el derecho de los farmacéuticos”*.

Es la primera victoria y presagio de lo que habría de ocurrir ocho meses después en el Tribunal Supremo.

Quizá los hechos contados de forma tan sucinta son poco reveladores de las luchas que se produjeron durante ese tiempo, de las explicaciones tan peregrinas (8) que encontró la Administración a su derrota, y del tiempo que tardó en llevarse a la práctica la sentencia por el agotamiento de los plazos legales (9).

Habían pasado cinco años en 1987, desde la publicación de un Real Decreto (10) que anunciaba la posibilidad de que hubiera especializaciones para los farmacéuticos, pero hasta entonces todo habían sido problemas.

Por una parte el Ministerio de Educación y, por otra, las organizaciones médicas, hicieron todo lo posible para impedir que hubiera farmacéuticos especializados en análisis clínicos, microbiología clínica y bioquímica clínica, aunque comprendían que existiera la especialidad de Farmacia Hospitalaria (11).

La creación de la Subdirección de Ordenación y Asistencia Farmacéutica, en la que fui su primer titular, supone un nuevo impulso para conseguir las especializaciones, pero el verdadero mérito hay que atribuirlo a un Subdirector del Ministerio de Educación ya fallecido, Fernando de la Torre, y a la Jefe de Servicio de Asistencia Farmacéutica, Ana Echevarría y a M^a Ángeles Monedero, que dependían de mí, a los que debemos aquellas especializaciones hospitalarias y las que vinieron años después, entre las que destaca la de Farmacia Industrial y Galénica promovida e impulsada siempre por el doctor José Carlos Montilla.

El acontecimiento que ocupó primeras planas de los periódicos ese año fue la venta de Antibióticos, S.A. por el dúo Abelló - Conde, a la multinacional italiana Montedison.

Mucho se ha escrito sobre esta operación, aunque mucho menos se sabe de la venta de Hubber, un gran laboratorio catalán, especializado en hemoderivados, que tuvo la desgracia de pasar primero a la órbita de Rumasa y luego al Patrimonio del Estado que lo cede a ICN Pharmaceuticals por una cantidad irrisoria.

Dentro del esperpento sanitario aparecen en escena en 1988 dos personajes que comienzan a librar una absurda batalla.

Se trata del Dr. Amat, médico alicantino que distribuye un medicamento de su invención llamado *Amatrisan* – a base de urea - con el que promete curaciones del cáncer, y el Dr. Chacón Megías, farmacéutico de Córdoba, que prepara unas vacunas que son prescritas por numerosos médicos y dispensadas como fórmulas en recetas de la Seguridad Social.

El Dr. Amat se tuvo que enfrentar a un proceso judicial que acabaría casi quince años después, dando con sus huesos en la cárcel, pero Fernando Chacón Megías va ganando todos los pleitos, comenzando por uno que obligó al Insalud a pagarle las recetas dispensadas como fórmulas magistrales y otro, en ese mismo año, que impuso al Ministerio la carga de realizar pruebas periciales para

determinar la eficacia de la llamada *“autovacuna para inmunoterapia específica de las enfermedades producidas por enzimas vivientes”* cuya versión moderna no es otra que el Bio – Bac del que todos hemos oído hablar más recientemente.

También en ese año se falló el último concurso de farmacéuticos titulares que se había convocado años atrás, de espaldas a la Dirección General de Farmacia.

Tras muchas dudas por parte de la Administración, se adjudican las plazas y se produce una violenta reacción por parte de los interinos, que se encierran en el Consejo General (12).

Los interinos llevaban razón, porque no se había seguido la cadencia de oposiciones y concursos establecida en la ley y porque habían pasado muchos años sin que se les hubiera dado una oportunidad.

En el cuerpo de titulares, muchos se encontraban en destino provisional, pero otros vieron la ocasión de ganar el concurso, vender su farmacia y abrir otra, a costa de dejar a un compañero sin sueldo y con la mitad de las ventas.

No se sabe si fue primero el anuncio del Colegio de Farmacéuticos de Madrid de reducir las farmacias de guardia de 40 a 26, o los ataques las organizaciones de consumidores tratando de que se liberalizase la venta de leches maternizadas en las grandes superficies (13). El caso es que ambos conflictos sucedieron a la vez, nada más comenzar el año 1989.

Tras casi ocho años desde el anuncio de una Ley del Medicamento en el programa electoral del Partido Socialista, se llega a su publicación en la Navidad de 1990 con Ignacio Lobato en la Dirección General.

Tras la promulgación de esta ley se producen dos reacciones contrapuestas: de una parte el Consejo General que no para en felicitarse por una buena negociación que se atribuye a sí mismo y, de otra, el presidente de Madrid, Pedro Gómez Agüero, que señala posibilidades de dispensación en paralelo y otras desgracias, algunas que se han confirmado por la capacidad normativa de las Comunidades Autónomas.

La elaboración de un código deontológico en 1991, financiado por el Consejo General de Colegios de Farmacéuticos, supuso aquel año una importante pérdida de consideración social. Pocas veces nos hemos visto tan vituperados los farmacéuticos en la prensa (14).

También ese año tiene su fin el Patronato Farmacéutico Nacional que era una institución creada en 1968 (15) por Orden del Ministerio de la Gobernación, aunque sus antecedentes son anteriores, pues surge como reconversión del Colegio de Huérfanos de Farmacéuticos constituido en 1942 para dar una mayor validez al artículo 23 de las Ordenanzas de Farmacia de 1860 en lo que se refiere a la protección de viudas y huérfanos, así como a los farmacéuticos septuagenarios.

No era el Patronato una institución de previsión en el sentido amplio, sino más bien de beneficencia, y su fin estaba cantado desde la inclusión obligatoria en 1978 de

los farmacéuticos en el régimen de trabajadores autónomos, y la extensión de la Seguridad Social mediante pensiones no contributivas a quienes las pudieran necesitar.

En la crónica negra, el secuestro de la farmacéutica de Olot M^a Ángeles Feliú conmocionó a la toda sociedad. Sin embargo, en el primer trimestre de 1994 tuvimos la buena noticia de su liberación.

M^a Ángeles había sufrido el secuestro más largo, hasta entonces, de la crónica de sucesos en nuestro país y habría que esperar todavía mucho tiempo para el esclarecimiento de los hechos.

Años más tarde otra farmacéutica, Flora Jerez, en este caso de Aranjuez, habría de ser secuestrada también, aunque por fortuna su liberación se produjo a los tres días.

El debate del año giró en torno a un editorial publicado en Scrip Magazine por el farmacéutico y editor de esta revista Philip Brown, que se preguntaba sobre la utilidad de los farmacéuticos y fue ampliamente contestado en mesas redondas y artículos de opinión.

En 1995 la Farmacia tiene que pelear día a día con el Tribunal de Defensa de la Competencia, que es como se llamaba por aquel entonces a la Comisión Nacional de la Competencia, que presidía Amadeo Petitbó, quien no escatima tiempo ni esfuerzos en transmitir que nuestra actividad es una de las causas de la falta de competitividad en el país.

Aunque el tema viene de años anteriores, propiciado por Miguel Angel Fernández Ordoñez, se recrudece en ese año con un primer borrador que elabora el Tribunal de Defensa de la Competencia, en el que atribuye a la farmacia el carácter de monopolio y una constelación de males que, según ellos, afectan al precio y la disponibilidad de los medicamentos.

4. APARECE UN DERECHA MODERNA

Al perder el apoyo parlamentario de Convergencia i Unió, el Partido Socialista no consigue sacar adelante la Ley de Presupuestos de 1996 y el Presidente González convoca elecciones para el día 3 de marzo.

La victoria del Partido Popular está cantada, pero nadie hubiera apostado a que iba a ser tan estrecha, ya que al Presidente Aznar le hacen falta los votos de casi todas las fuerzas nacionalistas para gobernar.

En la farmacia se vive con verdadera emoción el momento político, porque la ministra Ángeles Amador ya había amenazado con un Decreto de márgenes escalonados y había puesto en marcha otras muchas medidas dañinas para nuestra actividad, como la financiación selectiva de los efectos y accesorios o la salida de la farmacia de las leches maternizadas.

En los primeros cien días de gobierno se diseña un paquete de medidas liberalizadoras urgentes y a cada Ministerio se le piden las que considere que tienen este carácter.

El Ministerio de Sanidad, con José Manuel Romay al frente, se descuelga con un Decreto-Ley (16) sobre

liberalización del servicio farmacéutico que tiene como consecuencia práctica la libertad de horarios de las farmacias, y un aluvión de solicitudes de apertura que tuvieron que silenciarse publicando una nueva Ley (17) para arreglar el entuerto.

En el plano farmacéutico, 1996 es el año de la insumisión en los horarios, alentada desde el propio Gobierno, que los liberaliza en el Decreto-Ley. También es el año de la "Atención Farmacéutica", cuya presencia no falta en las distintas reuniones y congresos que se convocan.

El 25 de abril de 1997, se aprobaba la Ley más deseada, y más necesaria para arreglar el entuerto del año anterior: la que regula los servicios de las Oficinas de Farmacia, declarando normas básicas del Estado la unión inseparable de la propiedad y titularidad de las farmacias, la planificación y la libre transmisión entre farmacéuticos.

El medicamento del año es Viagra, que viene precedido de una inmensa campaña de prensa, pero que al final no fue capaz de levantar excesivas pasiones, tras conocerse que quienes más lo necesitan, se exponen a algunos riesgos, y además que tendrían que pagarlo de su bolsillo.

El incesante trabajo de Carlos Areses, presidente de la Asociación Española de Farmacéuticos Católicos, se verá recompensado con el éxito, y por fin una farmacéutica que había ejercido en Madrid, Elvira Moragas, nacida en un pueblo de Toledo, Lillo, que además fue una de las primeras mujeres que obtuvo el título de farmacia, llega a los altares, beatificada por Juan Pablo II.

A finales del mes de junio, y dentro de un paquete de medidas liberalizadoras de la economía, se aprobó el fatídico Real Decreto - Ley 5/2000 (18), un verdadero torpedo en la línea de flotación de las oficinas de farmacia, ya que hizo descender considerablemente la rentabilidad, y todavía ensombrece cualquier desarrollo futuro. El Decreto - Ley es obra del Vicepresidente Económico Rodrigo Rato, o más bien de su entonces Secretario de Estado Luis de Guindos, pero su ejecutora fue la Ministra de Sanidad Celia Villalobos.

La tradicional actitud combativa del Colegio de Valencia frente al Decreto - Ley, comienza a tener buena acogida en toda España y, se promueve una Ley de Iniciativa Popular que se impulsa para dar valor de bien esencial a los medicamentos y un papel relevante a los farmacéuticos.

En el verano, el terrorismo callejero de los Jarrai había reducido a cenizas la farmacia de Raúl Guerra Garrido, por su participación activa en el Foro de Ermua; y en el otoño fue asesinado Ernest Lluch, al que todo el mundo sanitario, de cualquier tendencia, ofreció un emocionado homenaje.

Frente a la política corporativa oficial, surge y se desarrolla en este año una fuerte oposición, que si bien tiene como punto de partida la Ley de Iniciativa Popular propugnada por el Colegio de Valencia (19), pronto se extiende a través de la Plataforma para la Defensa del Modelo Mediterráneo de Farmacia y aparecen núcleos de resistencia en grandes zonas de la geografía española.

En el mes de marzo, su principal impulsor, Salvador

Ibáñez, cayó enfermo, pero el movimiento no se paralizó en absoluto y la Ley llegó a Las Cortes, tras conseguir más de 500.000 firmas, donde fue finalmente rechazada por todos los grupos políticos, lo que no deja de ser sorprendente, y pone en evidencia que quienes impulsaban la ley eran unos románticos, mientras sus adversarios dentro de la Corporación hicieron funcionar sus influencias para que no fuese aprobada, aunque básicamente estuviesen de acuerdo con su contenido.

El tema central del año 2002 en la política corporativa es la posibilidad de aprobación de unos nuevos estatutos en el Consejo General, tema por lo demás recurrente, que acabó como siempre en algún cajón del Ministerio, provocó algún que otro movimiento entre presidentes y finalizó, también como siempre, desde la continuidad más absoluta; mientras sigue vigente el estatuto de 1957.

Una disposición largamente esperada fue la que aprobó el Formulario Nacional, que produjo una enorme insatisfacción entre los formulistas por sus grandes limitaciones ya que hubieran preferido una mayor libertad para formular principios activos que, aunque conocidos, no estuvieran entre los aprobados.

5. SOCIALISMO SEGUNDA PARTE

Todo sucedía en 2004 como había sido previsto, y Aznar cumplió su palabra dando paso a su sucesor a Mariano Rajoy, cuando nadie podía aventurar la tragedia que habría de ocurrir en Madrid el 11 de marzo que había de cambiar el signo de las elecciones que, al fin gana, el Partido Socialista.

A la izquierda le coge desprevenida su propia victoria electoral y, más desprevenida todavía, se encuentra la derecha, que inicia una dura oposición desde el primer momento de la nueva legislatura, y se manifiesta especialmente virulenta en el sector sanitario.

Tras la aparición de un documento apócrifo - sin duda una filtración interesada -, aparece el Plan Estratégico de Política Farmacéutica (20). También en torno a la misma fecha, se somete a información pública el texto de un Proyecto de Real Decreto que contiene todas las medidas económicas del Plan que, al final, es casi lo único que cuenta; porque lo demás no deja de ser un catálogo de buenas intenciones.

La propuesta de Pfizer de llevar a cabo el suministro directo a las farmacias viene acompañada por una evidente escasez de medicamentos, de este laboratorio y de otros que se suman al fenómeno, totalmente desconocido hasta ese año del suministro insuficiente.

Las autoridades encuentran el resquicio de que el mal suministro no es desabastecimiento - única figura sancionable - y transcurren los meses con problemas en la mayor parte de las farmacias; problemas que, desde entonces, no han desaparecido todavía.

Durante el año 2005, y entre los escándalos destapados por el gobierno socialista, aparece uno de indudable importancia pero que es rápidamente enterrado porque, al parecer, se practicaba incluso antes de la época de Aznar:

eran los llamados “gorros”, una modalidad de negociación para precios de productos patentados por la que se admitía un precio igual a la media europea – así se evitaban exportaciones paralelas – y el laboratorio se comprometía a devolver cantidades si superaban las ventas previstas.

¿Dónde iban esas cantidades? es algo que se ignora, y que ya nadie quiere saber. Probablemente a financiar la investigación, pero solo es una probabilidad.

Las comparecencias parlamentarias no aclararon mucho, y como era algo del pasado que afectaba a todos, desaparecieron, no sé si para bien o para mal.

El año 2006 viene marcado por la aprobación de la Ley de Garantías y Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios.

Durante el mes de julio – y en medio de los agobios de la aprobación de la nueva Ley del medicamento – se tuvo noticia de que la Comisión Europea había enviado un segundo aviso al Reino de España para que modificase su legislación sobre farmacias.

El 16 de marzo se publicó la Ley 2/2007 de Sociedades Profesionales que había despertado enormes expectativas entre algunos colectivos de farmacéuticos.

Pero las cosas comenzaron a variar ostensiblemente cuando se hicieron públicos importantes dictámenes jurídicos que demostraban cómo las oficinas de farmacia continuaban rigiéndose por su legislación especial y que la ley tomaba como base artículos concretos de la Constitución diferentes a los que regulan las cuestiones sanitarias.

Aun así, la Ley sí era aplicable a sociedades constituidas por farmacéuticos para realizar otras actividades diferentes al ejercicio en las oficinas de farmacia, por lo que los Colegios tuvieron que adaptar sus estatutos para admitir la figura del colegiado societario, excluidas las oficinas de farmacia.

En lo que se refiere a la ética y deontología profesional, el mayor acontecimiento del año es la victoria en el Tribunal Supremo de un farmacéutico granadino en defensa de la objeción de conciencia para no dispensar la píldora del día después, contra la que se ha prevenido la Ley de Farmacia de Andalucía, ya que las farmacias que no tengan “las existencias mínimas” entiéndase de este medicamento o anticonceptivos, pueden ver cómo la Junta de Andalucía puede instar de oficio la apertura de otra farmacia en su zona.

En 2008, ni los más agoreros habían podido imaginar, solo unos meses antes, que nos íbamos a topar con la mayor crisis económica que se recuerda.

Pero no todo iba a ser malo para los farmacéuticos, y a mediados de año ya hubo noticias de lo que podía hacer por nosotros en el Tribunal de Luxemburgo, el Abogado General Ives Bot sobre los Dictámenes Motivados a Italia y Alemania: un respaldo total y absoluto al modelo regulado español, y la posibilidad de una sentencia posterior que prácticamente impedirá al Comisario de la Competencia Mccreevy llevar al Reino de España ante Tribunal.

Una muy buena noticia que se produce en 2008 es la aprobación de la nueva carrera de farmacia, en la que se mantienen los cinco años y se adapta a una uniformidad de estudios que va a resultar difícil de cambiar porque responde a una Directiva europea.

La sentencia del Tribunal de Justicia de la Unión Europea del día 17 de mayo hará que el año 2009 se inscriba con letras de oro en la historia de la Farmacia. Es el fin de una época de incertidumbres para nuestro modelo de farmacia, que nunca más debería ser cuestionado, al menos a nivel comunitario.

En ese mismo año hay cambios trascendentes en la cúpula de nuestra Corporación: Pedro Capilla se retira, en una lacrimógena despedida, tras 40 años en el Consejo General de los cuales los últimos 21 son como presidente y los anteriores como secretario, y le sustituye Carmen Peña, Académica Correspondiente de esta Corporación y actualmente Presidenta de la Federación Internacional de Farmacéuticos.

Y también cambios en la Patronal FEFE donde Isabel Vallejo deja la Presidencia a Fernando Redondo que retiene a varios miembros de la Junta anterior como Angel Vives o Juan Vacas; y en el Colegio de Valencia en que Javier Climent deja la Presidencia a M^a Teresa Guardiola.

La recesión económica, la caída en la recaudación de impuestos, el cierre de empresas y los más de cuatro millones y medio de parados a los que se llega en 2010, abocaban a una situación de insolvencia económica que hizo levantar las orejas a los mercados, y pusieron al Gobierno en la difícil tesitura de implantar medidas económicas excepcionales para nuestro sector.

Lo que realmente caracteriza este año es la promulgación de dos Reales Decretos-Leyes que habrían de acabar con cualquier esperanza de mejora económica en las farmacias.

En el año siguiente tampoco falta otro Decreto Ley para tratar de controlar el gasto. El nuevo decreto 9/2011 es, en sí mismo, una nueva catástrofe para el sector farmacéutico.

6. VICTORIA DE LA DERECHA PARA SALIR DE LA CRISIS

La victoria del Partido Popular por mayoría absoluta en noviembre de 2011, y el desmoronamiento del primer partido de la oposición, anunciaron desde el primer momento que las cosas iban a cambiar, y de qué manera.

Las principales reformas, en lo que se refiere al sector farmacéutico, se abordaron por medio del Real Decreto Ley 16/2012, que supuso un importante cambio conceptual, ya que consiguió -por primera vez en muchos años que se contuviera la demanda de medicamentos, sin afectar al margen de las farmacias.

Los tres Reales Decretos Leyes de años anteriores habían centrado sus actuaciones en precios y márgenes, es decir en la oferta; mientras que éste aborda, además, cuestiones nuevas sobre la demanda.

Cuando media España sufría retraso en los pagos y el

Real Decreto Ley 16/2012 hacía descender las ventas como nunca se había visto hasta entonces, aparece un borrador de proyecto de ley del Ministerio de Economía que no esconde sus intenciones de separar la propiedad y titularidad en las farmacias, obligando a todas las organizaciones farmacéuticas a reaccionar nuevamente y desempolvar los informes utilizados para defender el modelo en Europa. La polémica dura todo el año, pero se desactiva finalmente.

Otro hecho reseñable en 2013 será una importante reforma de la Ley de Garantías, aprobada en el mes de julio, en la que además se traspone la Directiva sobre medicamentos falsificados que, aunque pasa por las Cortes casi sin pena ni gloria, puede tener una enorme importancia para acabar con algunas reliquias del pasado, como el famoso cupón-precinto implantado por la Seguridad Social, que al ser sustituido por un código bidireccional hará innecesario recortarlo y adjuntarlo como comprobación de la dispensación.

Y ya a punto de terminar el año, se aprueba la Ley Orgánica 9/2013, de 20 de diciembre, de control de la deuda comercial en el sector público, que abre fundadas esperanzas al cobro puntual de las recetas y las ventas a hospitales de la industria.

7. EL CONFUSO PRESENTE Y EL FUTURO QUE NOS ESPERA

Tras este repaso de acontecimientos y anécdotas que han caracterizado la evolución de la Farmacia desde la aprobación de nuestra Constitución en el año 1978, que he procurado exponer como una crónica amable de hechos y personas, es hora de hacer una breve síntesis sobre el ejercicio de la profesión y el sector farmacéutico.

Mi conclusión es que la aprobación de la Constitución de 1978, y que España se constituya como un Estado social y democrático de derecho, como proclama en su artículo primero, ha sido y sigue siendo un factor beneficioso para nuestra profesión.

Nuestro modelo de farmacia ha resistido a tres Leyes del medicamento, cinco Decretos Leyes perjudiciales para la economía del sector y un dictamen motivado de la Unión Europea, que podrían haber abocado bien a la estatalización o a la liberalización de las farmacias, con pérdida en ambos casos de la forma de ejercicio como profesión liberal.

Nada de esto ha ocurrido finalmente, aunque la economía de la farmacia y del sector se haya resentido en muchas ocasiones. Hemos avanzado, y mucho, respecto a Europa en conseguir especializaciones profesionales.

Tenemos una carrera de Farmacia homologada con los países de nuestro entorno y, precisamente el modelo de Farmacia que nos caracteriza, impulsa un elevado número de estudiantes en nuestras facultades y la presencia de farmacéuticos en todas las ramas de la ciencia y del mundo laboral.

Creo también que estos años son una magnífica lección de cómo debemos afrontar el futuro, aunque permanezcan

muchas cuestiones pendientes, como las que se refieren a nuestra estructura corporativa y la necesidad de avanzar en un verdadero derecho de sustitución, que es una realidad muy distinta a la nuestra en algunos países de nuestro entorno.

No podemos negar, sin embargo, que la Farmacia ha cambiado y se ha adaptado a los tiempos, tomando como suya la atención a los pacientes en el uso de los medicamentos, sin abandonar lo que realmente nos caracteriza, que es nuestra capacidad de hacer medicamentos, ya sea de forma individual o a escala industrial.

La farmacia asistencial contiene un impulso reformador que es capaz de superar la crisis de identidad vivida desde que acaba la elaboración de los medicamentos en la farmacia como actividad principal, para convertirla en mera dispensadora de medicamentos.

La atención farmacéutica y la prestación de servicios de valor añadido al paciente - para los que todavía se busca una remuneración en la farmacia asistencial - son las propuestas para una nueva era que supera las incertidumbres del pasado.

Soy particularmente optimista sobre el futuro de esta profesión aunque nada conseguiremos sin una buena dosis de inconformismo y un trabajo constante para renovarnos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Granda, E. *Crónica amable de la Farmacia en la España Constitucional 1978-2013*. Discurso de ingreso como Académico Correspondiente de la RANF. ISBN: 978-84-942290-8-4

Granda, E. *Crónicas Farmacéuticas de la Transición*. Revista Offarm. 1992-2005.

Granda, E. *Crónicas Farmacéuticas*. Revista Farmacia Profesional 2006-2014.

9. NOTAS

1. Orden dictada por Felipe IV en 1650 en la que se declara a la Farmacia Arte Científico, en todo igual a la medicina, eximiéndose por ello a los farmacéuticos de toda contribución gremial de oficios mecánicos y de la del comercio.
2. Este es uno de los llamados “*Reales Decretos*” promulgados por iniciativa del primer Director General de Farmacia, Juan Manuel Reol Tejada, que llegó a ocupar la presidencia de la RANF..
3. El expediente se sobreesayó a los pocos meses por el nuevo Gobierno.
4. El presidente del Consejo General de Médicos era por entonces Ramiro Rivera.
5. Raventós, F. Programa de acción para el sector farmacéutico. El País de 25 de mayo de 1983.
6. Provisión de vacantes por concurso de méritos, baremo de precios para las farmacias, expropiación en caso de necesidad, remuneración del farmacéutico como funcionario por medio de un convenio de relaciones laborales con el Sistema Nacional de Salud;

todo ello en la alternativa progresista. Mientras en la que podemos llamar liberal - conservadora aparecía la libertad de establecimiento con control de plantilla y de precios, así como la libertad de concertación con el Sistema Nacional de Salud o el mantenimiento de la farmacia en régimen privado.

7. Se publican numerosos artículos en la prensa como el de Juan Manuel Reol Tejada en ABC: *Sanidad, Sociedad y Toffler*; Carlos Ibáñez en el Boletín de Colegio de Madrid: *Los asesores de "Mi lobo"*. Jesús Ibáñez en Ya: *Decretos y Órdenes para una reforma sin ley*. Carlos Nicolás en el Médico: *El nuevo despotismo ilustrado de la Dirección General de Farmacia*. Ernesto Marco en ABC: *Otra chapuza en represalia contra los farmacéuticos*. Pedro Malo en ABC: *Gracias señor Lluch*. Lorenzo López Sancho en ABC: *Que viene el Lobo, farmacéuticos*. Editoriales como la de Ya: *Don Hilarión funcionario público*, o en Diario 16 *Amenaza a las farmacias*
8. El Ministerio buscó la explicación de que la Administración había perdido la guerra del margen por un programa de Televisión Española emitido días antes de elaborarse la sentencia en que se describía a Rafael Mendizábal Allende – presidente de la sala 3ª del Tribunal Supremo y ponente de la sentencia – como el alma del antiguo Tribunal de Orden Público que llevó a cabo, entre otras cosas, los fusilamientos del proceso de Burgos, cuando ya se había pasado de moda el régimen, la pena de muerte y otras manías de nuestros antepasados.
9. Las Cortes tuvieron que aprobar un presupuesto extraordinario de más de 10.000 millones de pesetas para parar a los farmacéuticos.
10. Real Decreto 2708/1982 de 15 de octubre que aprueba las especializaciones en Farmacia.
11. Aquel año se constituyeron las primeras Comisiones de las especialidades de y se expidieron los primeros títulos de especialista.
12. No hay que olvidar que los farmacéuticos titulares, tras la obtención de la plaza tenían la obligación de abrir farmacia en los pueblos, e incluso se les permitía hacerlo a la mitad de la distancia establecida, es decir a 125 metros de cualquier otra farmacia.
13. Los ataques en la prensa fueron frecuentes por aquella época: El diario El País de 27 de enero de 1989 se despachó con un editorial titulado "Farmacias de Noche" en que se leen los peores calificativos vertidos en la prensa sobre los farmacéuticos: "desfachatez corporativista"; "mezquindad"; "prepotencia" y "egoístas intereses de grupo", sin que ninguno de los representantes de la profesión se decida a sacar la cabeza debajo del ala.
14. El editorial de El País acababa con estas palabras: "El problema suscitado por el código deontológico de los farmacéuticos hace cada vez más urgente la regulación legal de la objeción de conciencia y la reforma de los colegios profesionales. La invocación

del derecho constitucional debe ser compatible con los derechos del ciudadano, y con mayor razón si afecta a la prestación de un servicio de carácter público. Los colegios profesionales, de otro lado, no pueden seguir constituyendo una especie de reinos de taifas con sus normas propias contradictorias a veces con las del Estado y prevalentes sobre ellas con evidente perjuicio de los intereses ciudadanos".

15. Orden del 12 de diciembre de 1968.
16. Decreto-Ley 11/1996 (derogado)
17. Es la Ley 16/97 que base de casi todas las regulaciones autonómicas.
18. El Decreto Ley se publica, siendo Ministra de Sanidad Celia Villalobos.
19. Las figuras de Mª Teresa Guardiola, Secretaria del Colegio, Pilar Machancoses Vicepresidenta, Javier Climent y otros muchos colegiados de base como Juan José de Torres, Arturo Pérez, Jesús Pedrajas, Álvaro Domínguez, Fernando Martín, Pepita Pedregal, Lucía Ruiz, o incluso no farmacéuticos como José Antonio Cano, resultaron decisivas para la tarea de reunir finalmente más de un millón de firmas.
20. Granda, E. Plan estratégico de política farmacéutica. Farmacia Profesional. Febrero 2005.



Pascual Bailón Hergueta Megino, pharmaceutical Party Molina de Aragón (1814-1896)

Title in Spanish: *Pascual Bailón Hergueta Megino, farmacéutico del Partido de Molina de Aragón (1814-1896)*

José Carrasquer Zamora¹, Adrián Ponz Miranda¹, Beatriz Carrasquer Álvarez², Jesús Tobajas Herrera³, Jesús Manuel Tobajas Galve, María Victoria Álvarez Sevilla¹

¹Grupo Beagle. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón. Universidad de Zaragoza.

²Centro de Investigación de Recursos y Consumos Energéticos. Universidad de Zaragoza. ³I.E.S. Molina de Aragón

ABSTRACT: In this work, biographical data about D. Pascual Bailón Hergueta Megino are presented. This pharmaceutical was born in Molina de Aragón (Guadalajara). He worked in the nineteenth century in his hometown. He defended as essential the academic training for their profession and argued in his prolific writings in professional journals against the intrusiveness and quackery. He was also an active supporter of social approaches to defend the interests of his people and province. He also showed great interest in collaborating with advances in botanical science necessary to develop new medicines. But never considered it above his dedication to pharmacy. This research summarizes all the biographical information found about Pascual Bailón, his works related to the profession of pharmacist and his contributions to culture and society of Molina. The work includes a complete inventory of its printed and handwritten work, as well as the authors who mentioned him or his works in their publications. It is understood that the work presented here can help to objectively evaluate the work of this pharmaceutical, which is of scientific and historical interest, having in regard the historical moment as well as the resources available by the author.

RESUMEN: En este trabajo se presentan datos biográficos de D. Pascual Bailón Hergueta Megino, farmacéutico nacido en Molina de Aragón (Guadalajara). Ejerció en el siglo XIX en su pueblo natal. Defendió como imprescindible la formación académica para su profesión y argumentó en sus abundantes escritos en los periódicos profesionales contra el intrusismo y la charlatanería. También fue un activo defensor de sus planteamientos sociales, apoyando cuando tuvo oportunidad los intereses de su pueblo y provincia. Asimismo tuvo interés en aprender y colaborar en la nueva ciencia botánica necesaria para elaborar los crecientes medicamentos que ofrecía su conocimiento, pero en ningún momento la valoró sobre su dedicación a la farmacia. En esta investigación se recoge la información biográfica encontrada acerca de Pascual Bailón, sus obras referidas a la profesión de farmacéutico y también sus contribuciones a la cultura y a la sociedad molinense. Se ha realizado un inventario lo más completo posible de su obra impresa y manuscrita, así como la de autores que lo citan a él o a sus trabajos. Se entiende que la información que aquí se presenta puede ayudar a valorar objetivamente el trabajo realizado por este farmacéutico, su interés científico e histórico, teniendo en cuenta el momento y los recursos disponibles por su autor.

*Corresponding Author: josecarr@unizar.es

Received: November 29, 2015 Accepted: December 14, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 4 (2015), pp. 319-328

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La biografía más extensa acerca de D. Pascual Bailón Hergueta Megino nos la presenta Roldán en su trabajo sobre farmacéuticos españoles (1). También sus manuscritos botánicos recibieron cierta atención por otros autores, como Mas y Guindal (2, 3) que describe el contenido de los tres manuscritos sobre la Flora de Molina y Segura de Baños existentes en la biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia y remitidos por Hergueta. Font Quer (4) también cita los trabajos de Hergueta. Asimismo Jaime Lorén (5) se refiere a un manuscrito de Pardo y firmado por Loscos, en el que se hacen comentarios poco favorables acerca del trabajo de Hergueta sobre las plantas de Segura de Baños. La obra

impresa más conocida del autor y citada por diversos escritores molinenses es un librito acerca del paraje de la ermita de La Virgen de la Hoz (6).

Tras llevar a cabo un sondeo bibliográfico, se ha constatado que tanto la biografía de este farmacéutico como su obra han llamado poco la atención desde la profesión farmacéutica y cuando se ha hecho ha sido en obras generales referidas a Molina para citar brevemente alguna de sus obras. Es decir, Hergueta parece no haber tenido una recompensa individual al trabajo realizado durante toda su carrera profesional. Sin embargo, tras una visión inicial de sus obras, se cree que merece al menos una recopilación general de sus datos biográficos y de su trabajo, que es lo que se pretende llevar a cabo en el

presente documento, que pueda conducir en el futuro a un análisis y valoración de sus méritos. Con anterioridad a este trabajo ha sido publicada la transcripción del manuscrito sobre las plantas de los Baños de Segura, Teruel (7).

2. LA FARMACIA EN ESPAÑA EN EL SIGLO XIX

Pascual Bailón vivió en un periodo importante para la ciencia farmacéutica y cuatro aspectos relacionados con su profesión son los que se quieren resaltar: su formación académica; su participación en los medios de comunicación escritos; su opinión sobre la creación de farmacias centrales y sobre la ciencia botánica.

El siglo XIX sembró las bases para el desarrollo de gran cantidad de sustancias con uso terapéutico, lo que hoy entendemos como medicamentos, que progresaron gracias a un gran esfuerzo investigador y tecnológico, que también tuvo mucho que ver con los avances en el estudio y en la utilización de las plantas como remedios curativos.

Paralelamente la reglamentación y formalización de la profesión de farmacéutico también se fue regularizando en los diversos ámbitos, político, profesional, formativo o científico, pero con una progresión compleja y a lo largo de muchos años. Estos aspectos han sido tratados por diversos autores (8-14) y en lo que a este trabajo respecta el interés radica en la información relevante para determinar qué estudios y dónde los cursó Pascual Bailón Hergueta. Las *Ordenanzas de Farmacia* de 1804 sobre los estudios de farmacia, provocaron la creación de Colegios para la formación, constituyéndose formalmente en 1806 el *Real Colegio de Farmacia de Madrid*, continuador del *Real Colegio de Boticarios de Madrid*; al finalizar la guerra de la Independencia pasó a denominarse *Real Colegio de Farmacia de San Fernando* y posteriormente *Colegio de Farmacéuticos de Madrid*. Ocupará a lo largo de los años diversas sedes. En un principio estará en la calle Atocha, hasta 1815 que ocupa un local en la calle del Barco, nº 20; en 1827 fue trasladado a la calle de San Juan, actual calle de La Farmacia y será donde curse sus estudios Hergueta. Este organismo es considerado como la máxima institución científico-farmacéutica de su tiempo (Hergueta aparece inscrito en el año 1858, con el número 526) y es antecesor de la actual *Real Academia Nacional de Farmacia*. El *Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid* es otro organismo creado a finales del siglo XIX con funciones estrictamente profesionales.

Los periódicos profesionales de la farmacia surgen como soporte para la difusión de los avances científicos y como medio de propagación de demandas y peticiones de cambios profesionales teniendo una función importante en estos años (15). En el caso concreto de Hergueta, parte de su obra fue escrita en los periódicos farmacéuticos, de algunos de los cuales era colaborador y en los que se puede encontrar la información necesaria para intentar desentrañar su personalidad, su pensamiento, así como para entender los motivos del olvido de su persona y trabajo profesional.

A mediados del siglo XIX, en la profesión

farmacéutica se genera un conflicto como consecuencia de diferencias en el planteamiento acerca de cómo se puede gestionar la creciente industrialización de la fabricación de los medicamentos. Es bien conocida la beligerancia de parte de la profesión farmacéutica contra los drogueros, que venden todo tipo de productos ya elaborados y considerados como exclusivos de las farmacias. Sin embargo, entre algunos farmacéuticos formados académicamente surge la idea de las *farmacias-droguerías*. Estas empresas, conocidas también como *farmacias centrales*, fabricarán medicamentos a gran escala y harán de suministradores a oficinas más pequeñas. La indicada animadversión hacia los drogueros hace que haya profesores de farmacia en contra de este planteamiento, entre ellos Hergueta. Uno de estos proyectos y de gran envergadura es el que lidera la Farmacia Central de Valladolid y su periódico, *El Droguero Farmacéutico*, a través del cual se propuso la iniciativa de elaborar un *catálogo de las plantas de España* con el objetivo de disponer de una *flora farmacéutica*. Paralelamente surgió otro proyecto similar liderado por *Colegio de Farmacéuticos de Madrid* (a partir de ahora CFM) (16-19).

Ambos proyectos recibieron trabajos de los farmacéuticos y algunos de ellos fueron publicados en *El Droguero* y en *El Restaurador Farmacéutico* (a partir de ahora RF), este último considerado como el órgano oficial de comunicación del CFM. Estos trabajos, de diversa calidad y planteamiento, fueron utilizados en mayor o menor medida por diversos profesores para redactar memorias que contribuyeron a un mejor conocimiento de la flora de la Península y del uso local que de las diversas especies se hacía en farmacia (19).

Hergueta elaboró y envió al CFM sus trabajos botánicos, siendo publicado únicamente el relativo a las plantas de los Baños de Segura en las páginas de RF (20), pero con diferencias respecto al manuscrito original (7).

3. DATOS BIOGRÁFICOS

Pascual Bailón Hergueta Megino nació en Molina de Aragón y falleció en Tortuera el 3 de abril de 1896 a los 81 años de edad. Otras fuentes (1) indican que nació el 17 de mayo de 1820, pero esta fecha es contradictoria con los datos de su partida de defunción.

Realizó sus estudios de Farmacia en Madrid, finalizando en 1838. Si se toma como referencia las fechas de implantación de los títulos de Farmacia indicados anteriormente, Hergueta debió estudiar en el *Real Colegio de Farmacia de San Fernando* de la calle San Juan. Al año siguiente de terminar sus estudios ya era farmacéutico en Molina de Aragón (21-23). Ejerció su profesión hasta 1890, año en el que se retiró a Tortuera (1).

Desde el primer año de su ejercicio profesional en Molina hasta 1858 ocupó el cargo de Subdelegado de Farmacia del partido Judicial, del que fue depuesto por motivos políticos (24, 25).

Fue hijo de Francisco y Manuela, ambos de Molina de Aragón y de su matrimonio nacieron tres hijos, Adrián,

que falleció tempranamente (6), Aurelio y Benito, estando casados al fallecimiento de su padre, ya viudo (26).

3.1. *Sus estudios*

Tal como se ha indicado anteriormente Hergueta se graduó en el *Real Colegio de Farmacia de San Fernando*, cursando las cuatro asignaturas anuales, Ciencias Naturales, Física y Química, Farmacología y Práctica Experimental. Los catedráticos responsables de las asignaturas fueron respectivamente, Nemesio Lallana (1834-35), José Camps y Camps (1835-36), José Martín de León (1836-37), y Diego Genaro Lletget (1837-38) (27).

3.2. *Su trabajo como farmacéutico*

La primera referencia de su colaboración en periódicos de medicina o farmacia se trata de un texto, al parecer demasiado extenso y que resumió M. Delgrás (22), director del *Boletín de Medicina, Cirugía y Farmacia*. En esta primera contribución periodística incide en tres puntos: abandono de las boticas por parte de los titulares, dando lugar a peligrosas sustituciones; rebajas de las igualas, desleales y en contra de la labor profesional, por parte de profesionales con el fin de hacerse con clientes; indiferencia de las autoridades ante estas conductas.

Estas reivindicaciones, que no eran nuevas entre los profesionales de la farmacia de la época, serán una constante durante muchos años y se pondrán de manifiesto en sus escritos. Las soluciones propuestas pasan por una adecuada formación académica y moral para alcanzar el título de farmacéutico y la consolidación de las subdelegaciones de farmacia, facilitando las inspecciones de las boticas en visitas extemporáneas y gratuitas para los farmacéuticos.

La última evidencia escrita que se ha podido consultar acerca de la actividad profesional de Hergueta es un acta de la visita a una botica con motivo del traspaso de titularidad en 1881; firma el documento como Subdelegado de Farmacia del Partido y como Visitador (25).

En el año 1858, Hergueta está inscrito en el CFM como único farmacéutico de Molina, con el nº 526 (28). De otros compañeros de profesión, solamente se tiene la referencia de que en 1866 también había en Molina otros tres profesores de farmacia, D. Ramón García, D. Victor Malo y D. Agustín Canani (29).

3.3. *Actividad social y política*

Su faceta de escritor también se puso de manifiesto sobre aspectos que no tenían que ver directamente con la farmacia. En el libro inédito *«Hijos Ilustres de Molina y pueblos de su Señorío»* escrito por el cronista de Molina, D. Claro Abánades López, se refiere al farmacéutico en este párrafo:

«Hergueta.-Don Pascual.- Muy entusiasta de las glorias del Señorío. Fue farmacéutico y escribió varios folletos, en los que resaltaba su creadora fantasía. Entre otros, conocemos 'Bromazos poéticos prosáico-carnavalescos' y 'Breve estudio de las maravillas de la

naturaleza' sobre el Barranco de la Hoz.» (30).

A través del desempeño de su labor profesional, Hergueta tiene contacto con la política farmacéutica, pero también con la política social. Tres momentos importantes se traslucen a través de los escritos y la bibliografía consultada: marzo de 1857, agosto de 1860 y octubre de 1868.

En las cortas palabras de la hoja manuscrita indicada anteriormente (21) pone de manifiesto que ha sido depuesto como Subdelegado de Farmacia en el Partido Judicial de Molina de Aragón. El motivo fueron las elecciones a Cortes Generales que tuvieron lugar el 25 de marzo de 1857. Hergueta tomó partido por Victor Tomás Muro que salió perdedor frente a Fernando Urries Bucarrelli. Tomás, había participado activamente en la recaudación de fondos para paliar la epidemia de cólera que azotó la Península (1853-1856) (31). Respecto a esta epidemia se generó una discrepancia entre la postura política que defendía que no se debía incorporar en los mensajes y discursos la palabra contagio y la sanitaria que opinaba lo contrario. También influyeron entre las discrepancias de uno y otro bando las cuarentenas y sus periodos, dado que este aspecto podía influir negativamente en el comercio.

También ejerció como ciudadano molinés defendiendo los intereses de su tierra y de sus paisanos. Como muestra de su generosidad y valentía fue uno de los diez ediles molineses que firmaron la carta enviada el 18 de agosto de 1860 a la Reina Isabel II, recordándole la simbología histórica del Castillo de Molina, ante la intención generada desde distintas instituciones y con diferentes intereses, de derruir este emblema molinés (32, 33).

También se debe tener presente otro acontecimiento político que sucederá posteriormente. El 9 de octubre de 1868 se constituye un Gobierno Provisional Nacional, que obligará a Isabel II a salir de España (34). Hergueta es nombrado vocal de la Diputación Provincial de Guadalajara, cargo que desempeñará escasamente un mes, aunque lo dejará marcado políticamente.

3.4. *Actividad como botánico*

Al contrario que otros farmacéuticos que llegaron a tener una gran formación como botánicos y un gran reconocimiento como tales a nivel nacional y europeo, Hergueta no tuvo a esta ciencia como centro de atención prioritaria, pero como farmacéutico debía conocer los últimos avances en la botánica y la sistemática para la identificación de plantas, conocimientos necesarios para llevar a cabo su trabajo. De hecho, fue de los primeros farmacéuticos que contestaron al requerimiento de CFM, al elaborar un listado con las plantas de su Partido. En escasos cinco meses redactó un primer listado acomodándose, en parte, al sistema binomial de Carlos Linneo. El siguiente trabajo lo remitió meses más tarde, completando y corregido, con más calidad y mayor información. Su tercer y último trabajo botánico fue sobre las plantas de Segura de Baños. En tres años avanzó en el conocimiento botánico de las plantas de su Partido Judicial

y de Segura de Baños. Posteriormente, 1866, este último trabajo lo enviaría con modificaciones al RF para su publicación, tal como se ha indicado anteriormente.

Pero sin duda Hergueta no consideraba oportuno dedicar excesivo tiempo a otra ciencia, que por sí sola requería tiempo completo, tal como puso de manifiesto al final de su trabajo sobre Molina (35):

«Si hubieran de mencionarse las infinitas producciones que constituyen el delicioso panorama de la Flora molinense, preciso nos sería abandonar nuestros compromisos profesionales, para engolfarnos en el insondable piélago de la ciencia mas brillante: la botánica.[...]».

Con el mismo título de la publicación anterior aparece citado por algunos autores un folleto publicado en Madrid (36-38).

En su primer trabajo de taxonomía botánica, siguiendo las recomendaciones del CFM, utiliza el sistema binomial de Linneo para identificar las plantas pero las ordena por el «método natural ó de familias», diferente al sistema propuesto por el naturalista sueco.

Pero, a qué autores botánicos leía Hergueta y utilizaba como referencia. Este fue uno de los problemas con los que se encontró el proyecto de la *flora farmacéutica*. Los farmacéuticos colaboraron con sus catálogos de plantas, pero gran parte de ellos no indicaban cuáles eran los autores de referencia (17). Tampoco Hergueta, excepto en el catálogo de las plantas de los Baños de Segura en el que hace mención a que están «clasificadas por el sistema sexual del caballero Carlos Linneo y por el método natural de Jussieu [,] De-Candoll y otros» (7).

Es sus textos impresos y atendiendo a las citas que realiza de diversos autores, aún sin indicar año y obra puede deducirse en algunos casos qué bibliografía utilizaba. En el libro del farmacéutico más conocido «Breve estudio de las Maravillas de la Naturaleza» (6) hace referencia a varios autores, entre ellos, diversos clásicos como Platón, Tales de Mileto, etc.; cita a Petavio (39) para explicar «una razón cosmogónica de la existencia de estos materiales», refiriéndose al gran cataclismo que sufrió la corteza terrestre; entre los naturalistas cita a Linneo y a Buffon, al primero tal vez por confusión le atribuye la repetida frase de Plinio, «¡Tanta vox tam parvo in corpusculo! ¡Tam pertinax spiritus! Spiritu prius deficiens quam cantu.» (40); de Georges Louis Leclerc, conde de Buffon traduce unos párrafos dedicados a la cabra (41); entre los autores que hicieron avanzar la ciencia farmacéutica Hergueta cita a Mateo Orfila, menorquín que desarrolló su trabajo en toxicología y farmacología en Francia. También manifiesta su interés por la apicultura traduciendo un amplio fragmento de Virey (42). En este libro Hergueta evidencia sus conocimientos sobre plantas, sin embargo será el escrito sobre la dedalera con hoja de gordolobo (43), el primero publicado en el que de manera explícita desvela su interés por la botánica. En este artículo hace referencia a la obra Linneo (44) y en concreto dice,

«[...] solo en el Resumen de la parte práctica de botánica del Caballero Carlos Linneo y en su página 358 se lee: Dedalera tapsi con hojas escurridas.».

En el año 1871 envía para su publicación al periódico *La Farmacia* un trabajo sobre las setas y hongos de su partido judicial (45) sin hacer mención a ninguna cita bibliográfica.

Antes de terminar este apartado, es preciso mencionar que Nicolás López de Amaya elaboró en el año 1781 a petición de Casimiro López Ortega, un listado de plantas del Señorío de Molina (46), manuscrito que puede ser considerado como la primera relación que existe de plantas del Término de Molina.

3.5. Polémica sobre el *Xanthium spinosum*.

En el 1876 se inicia una discusión con motivo de unos comentarios realizados por Hergueta en *La Farmacia Española* (47) respecto a la carruchera, *Xanthium spinosum*. Hergueta escribe tres cartas consecutivas dedicadas a la planta, incentivado por una noticia aparecida en el *Journal de Therapeutique* de la que se hace eco *El Imparcial*. El artículo hace referencia a la investigación del Dr. Etienne Grzymala sobre la utilización de la hoja seca de la carruchera para curar la rabia. El *Journal* fue uno de los periódicos profesionales con mayor influencia en Francia y también en España durante sus años de edición (51). El artículo de Grzymala tuvo una gran repercusión en toda Europa y diversas publicaciones tratan la noticia (48-56), por lo que Hergueta no fue el único que quiso difundir los trabajos del Dr. Grzymala sobre la carruchera.

Sin embargo a las cartas de Hergueta replicará el Dr. Rodenisky en *El Anfiteatro Anatómico Español* y *El Pabellón Médico* con un suelto jocoso, satirizando los escritos. Hergueta contestará y se generará una larga discusión periodística de más de un año (57-67) entre Rodenisky, Pulido, Hernando y el propio Hergueta, enzarzados en una larga polémica, que evolucionará a asuntos personales que poco tenían que ver con las motivaciones iniciales acerca de propiedades o usos de la planta.

Estas cartas tienen interés por varios motivos. Además de dar información acerca de la personalidad de Hergueta, el autor cita a diversos autores clásicos, pero también botánicos, informándonos de esa manera quiénes eran los autores de los que se nutría y dónde compraba sus libros, ya que cita a la Librería Internacional Carlos Bailly-Bailliere de Madrid. Cita por ejemplo a «*Aquiles Richard, Guibourt, Tournefort, Roberto Prrown, Decandolle, Jusieu, Cassini, Aute, Hofm y Colmeiro, etc., [...]*» (61).

También cita al Dr. Casimiro Gómez de Ortega como primer catedrático del Jardín Botánico de Madrid y autor de las dos ediciones del Curso Elemental de Botánica (68, 69), de las que se deduce su consulta por explicación de citas concretas. Asimismo el texto de Vicente Cutanda sobre la Flora de Madrid (70), del que hace una cita referente al fruto del *Xanthium spinosum*.

También cuando Hergueta cita a Richard, indica una

página donde se define la diferencia entre la nuez y la drupa. En uno de los múltiples libros de Richard (71) es donde se indica la diferencia entre esos dos frutos (Por error en el texto de Hergueta se cita la página 208 cuando es la 268). Este detalle, sumado a que es el primer texto citado por Hergueta, permite afirmar que éste era uno de los más utilizados por él.

La taxonomía utilizada más frecuentemente por los botánicos y farmacéuticos del siglo XIX y entre ellos Hergueta fue la «*natural o de familias*» creada por De Candolle (72-74), que casi de forma generalizada desplazó a la de Linneo en esa época.

3.6. Los manuscritos botánicos

El RF realizó un primer llamamiento a los profesionales de España solicitando colaboraciones para realizar un inventario de las plantas utilizadas en las boticas (2, 17, 18). Hergueta realizó tres envíos manuscritos. El primero de ellos (23), que incluye un primer listado de las plantas de Molina no tiene fecha, pero con toda probabilidad llegó acompañado de una nota manuscrita (21) de presentación del autor:

«D. Pascual Bailón Hergueta, individuo corresponsal del Ilustre Colegio de farmacéuticos de Madrid, reside en la ciudad de Molina de Aragón. Tiene título de licenciado, espedido en Madrid á 7 de Agosto de 1838, registrado al folº 95 del libro correspondiente.

Ha egercido el cargo de subdelegado de este partido desde septiembre de 1839 hasta marzo de 1857 del que fue depuesto por el Gobernador de la provincia de Guadalajara, por motivo de elecciones de diputados á Cortes.

Ha escrito algunas memorias científicas, aunque de escaso mérito, siendo bien conocido su celo por el decoro de la profesión. Molina, 17 de Mayo de 1858. Pascual B. Hergueta ».

Este primer manuscrito sobre las plantas de Molina es un listado de nombres científicos dispuestos según el «*método natural o de familias*», según palabras del propio autor.

El segundo manuscrito titulado *Flora Molinesa* (75) está formado por un índice de las especies agrupadas por familias y, posteriormente, otra parte del documento en el que se enumeran nuevamente las especies, con indicación de su nombre científico, posibles sinónimos, nombres comunes, localidades del Partido de Molina donde puede encontrarse, momento de recolección y otros datos de interés botánico.

El tercer manuscrito se refiere a las plantas de Los Baños de Segura (Teruel) en el que, además de datos de interés botánico, el autor incluye información acerca de su uso en la farmacia (7, 76).

3.7. Colaboraciones en revistas farmacéuticas

- 1839. *Boletín de Medicina, Cirugía y Farmacia* (23).
- 1845. RF (77).
- 1846. RF (78, 79).

- 1851. RF (80-82).
- 1853. RF (83).
- 1861. RF. (84-86).
- 1861. Colaboración colectiva con *La España Médica, Iberia Médica y Crónica de los Hospitales*. (87).
- 1862. RF. (88).
- 1864. *El Genio Quirúrgico*. (89).
- 1865. RF. (90-93).
- 1865. RF. (43).
- 1866. RF. (94, 20, 95, 29, 96).
- 1870. RF. (97).
- 1871. *La Farmacia Española*. (98, 99).
- 1871. *La Farmacia Española*. (45).
- 1876. *La Farmacia Española*. (100, 479, 101, 57, 58, 61, 63, 65, 67).

4. AUTORES QUE CITAN A HERGUETA

Pascual Bailón no solo escribió diversos libros, colaboraciones periodísticas y catálogos botánicos, sino que también ha sido citado por otros autores en obras de geomorfología, geología, política, botánicas, farmacéuticas o sobre plantas medicinales. Algunas de éstas son las siguientes.

Carlos Castel (102), cita la Reseña física y natural de Molina de Hergueta (103), refiriéndose a las aguas sulfurosas existentes en la Huerta del término de Rinconcillo.

Miguel Colmeiro y Penido en su obra sobre las plantas de la Península y Baleares se refiere al trabajo sobre las plantas de los Baños de Segura publicado en *El Restaurador* (20). En el tomo I (104) cita al *Adonis aestivalis* L. y en el tomo III (105) se refiere a la *Chondrilla juncea* L. ambos indicados por Hergueta en su trabajo.

También Sergio Caballero y Villaldea (37) se refiere a la reseña que Hergueta (103) escribió sobre la geografía física y natural de Molina.

En el discurso inaugural del curso 1941-42, Joaquín Más y Guindal (3) cita en varias ocasiones a Hergueta, indicando que recomienda utilizar *Artemisia Aragonensis* y las hojas de la *Brunella vulgaris* para combatir las fiebres tercianas; o que la *Psoralea bituminosa* se usó contra los dolores de muelas; también que se utilizan como emetocatórticas las semillas del *Atriplex hortensis* y del *Sedum acre* y las hojas y raíces de *Scrophularia aquatica*; y que para combatir las úlceras se utiliza la *Achillea Millefolium*.

Nuevamente Más y Guindal (2) cita a Hergueta, pero en este caso para hacer una reseña de los manuscritos conservados en la biblioteca de la *Real Academia de Farmacia*, al igual que hace con los escritos de otros farmacéuticos.

José Luis Pensado Tomé (106), al tratar del término *Arangaños*, se refiere a las semillas del beleño utilizadas para dolencias del oído. Sin embargo, los usos en Molina de Aragón citados por Hergueta se refieren a las muelas.

Pío Font Quer (4) en el texto referido al beleño negro dice:

«En Molina de Aragón, a la semilla del beleño la llaman pólvora del diablo; y según Pascual B. Hergueta, de quien tomo la noticia, 'se cree eficaz para calmar el dolor de muelas, quemándola sobre las ascuas y poniendo encima un embudo para recibir el humo'. Según este autor, sobre las ascuas, saltan los embriones de las semillas, y las gentes creen que son los gusanos de las muelas[...]».

En el mismo libro Font Quer, en las referencias bibliográficas, se citan dos de los manuscritos de Hergueta (23, 76).

En su trabajo sobre los aragonitos Sanz y Díaz (38), en la bibliografía se refiere al trabajo de Hergueta sobre los paisajes de Molina (103).

Francisco Rodríguez de Coro en su obra sobre el sexenio democrático (1868-1874) en Guadalajara (34) el autor reproduce un manifiesto en el que una recién nombrada Diputación Provincial interina se dirige al pueblo de Guadalajara. La Diputación es presidida por Diego García y entre los vocales se encuentra Hergueta.

José María Jaime Lorén (5), al estudiar los archivos de José Pardo existentes en el Jardín Botánico de Valencia, se refiere a un documento manuscrito (107) escrito por Pardo y también firmado por Loscos en el que se hacen comentarios poco favorables acerca del trabajo de Hergueta sobre las plantas de los Baños de Segura. En otro trabajo Jaime (108) se refiere a un libro del autor Martín de Argenta, propiedad de Pardo y sobre el que en sus márgenes hay escritos, entre otros, comentarios sobre el mismo trabajo de Hergueta.

Salvador Calderón y Arana (36) también cita la *Reseña física y natural de Molina de Aragón* (103). Herrera (109) también cita el libro *el Breve estudio de las maravillas de la naturaleza, en especial del valle de la Hoz* (6).

Cirujano y Medina (110) y Medina (111) se refieren al manuscrito de Hergueta (75) en el que se cita la *Nymphaea alba* L., como planta que se encuentra en el río Gallo.

5. CONCLUSIONES

Pascual Bailón Hergueta ejerció como farmacéutico en un periodo de la historia de España en el que todavía los curanderos y charlatanes recorrían ambulantes por los pueblos, sin ningún tipo de control de la autoridad, y ocasionaban una competencia desleal frente a lo que comenzaban a ser unos profesionales preparados para poner en práctica los conocimientos científicos de la época. Pero tampoco todos lo que tenían farmacia abierta cumplían sus obligaciones con el decoro deseable. El carácter de Hergueta le obligaba a tomar partido público por lo que consideraba justo, tanto en el ámbito profesional, político o social. Y este planteamiento de defensor de sus ideas, sin duda le ocasionó problemas, tanto a nivel social como a nivel político. Tomó partido, enfrentándose al gobierno vigente con motivo del derribo de la muralla de Molina y también con su nombramiento

como miembro de la Diputación Provincial interina de un gobierno anticlerical.

Sin embargo, sus convicciones religiosas, que se ponen de manifiesto en algunas de sus tempranas publicaciones, no impidieron que se enfrentase por motivos sociales, políticos o profesionales a los que pudieran considerarse en un principio personas o colectivos más afines a sus planteamientos. Posiblemente esta circunstancia le condujo al final de su vida a quedar en *tierra de nadie* y que en cierto modo haya sido un personaje, si bien reconocido como un ilustre molinés, del que no ha sido reivindicada su figura y su trabajo profesional. Precisamente sus obras relacionadas con la cultura molinesa son las más citadas; sin embargo, su figura como defensor de la profesión y su trabajo botánico no ha sido reconocido. Sin duda otros muchos farmacéuticos defendieron en esa época los mismos planteamientos que Hergueta, pero él también.

Por otra parte, la polémica del *Xanthium spinosum*, marcó el final de sus colaboraciones escritas, desconociéndose nuevas actividades hasta la fecha de su jubilación en 1890, a excepción de un documento de venta de una farmacia existente en el Archivo Municipal de Molina.

En el campo de la botánica es preciso tener en cuenta sus palabras acerca de que era una nueva ciencia que requería prácticamente una dedicación a tiempo completo y él no estaba dispuesto a dejar su principal dedicación, la farmacia. Tal vez por estos planteamientos fue criticado, en exceso, por sus trabajos botánicos por Loscos y Pardo; posiblemente porque el primero de ellos, durante algunos periodos desatendió los trabajos de su botica en Castelserás, colaborando notablemente en el avance científico de la botánica de Aragón y en concreto de la provincia de Teruel, pero dejando la botica en manos de mancebos.

Por lo anteriormente expuesto se considera que Pascual Bailón Hergueta Megino, ha de tener un lugar en la historia de la farmacia española.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su dedicación a las trabajadoras y encargadas de la Biblioteca del Campus Universitario de Teruel de la Universidad de Zaragoza; asimismo a las del Archivo Municipal de Molina de Aragón y los del Archivo y Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia, por su colaboración y trabajo, que sin duda ha ido más allá de sus obligaciones. Especialmente se quiere agradecer al archivero de esta última biblioteca, que localizó la nota manuscrita (21) que permitió confirmar el lugar y la fecha de los estudios de Hergueta.

José Carrasquer, Adrián Ponz y María Victoria Álvarez pertenecen al Grupo Consolidado de Investigación Aplicada Beagle (BOA, 9/5/2008), financiado por el Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y el Fondo Social Europeo. Asimismo pertenecen al Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales.

7. REFERENCIAS

1. Roldán R. Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos Españoles. Madrid: Gráficas Valera 1958-1963. Edición facsimil, Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 2003.
2. Más y Guindal J. Materiales aportados por los farmacéuticos en pro de la Flora medicinal española. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 1942; 8, 233-265; 244-247
3. Más y Guindal J. Fitoterapia Vulgar Hispana. Concepto de su flora. Las investigaciones fitoquímicas. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 1941; 7, 8, 11.
4. Font Quer P. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. 8ª ed. Barcelona: Editorial Labor 1983; 573, 972.
5. Jaime Lorén JM. Documentos del archivo de J. Pardo Sastrón en el Jardín Botánico de Valencia. *Flora Montiberica* 1997; 7:7-31.
6. Hergueta PB. Breve estudio de las Maravillas de la Naturaleza. Madrid: Imprenta de la Regeneración 1858.
7. Tobajas J, Carrasquer J. Transcripción del manuscrito: Relación de las plantas que viven en los Baños de Segura en Aragón. Escrito por D. Pascual Bailón Hergueta Megino. Julio de 1860. Edición digital: Liber Factory 2012. Disponible en: (<http://www.todoebook.com/lista.aspx?titulo=transcripci%C3%B3n>).
8. Miguel A, González Bueno, A. La Biblioteca del Real Colegio de San Fernando de Madrid (1806-1843). *Asclepio* 1992; II: 193-205.
9. Astrain M. El Real Tribunal del Protomedicato y la profesión quirúrgica en el siglo XVIII. *Dynamis* 1996; 16: 135-50.
10. Campos MS. El Real Tribunal del Protomedicato Castellano (Siglos XIV-XIX). Cuenca: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha 1999.
11. Gallego C, Méndez JA, Coord. Historia de la biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid. Madrid: Editorial Complutense 2007, 92.
12. Puerto FJ. Historia de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 2012.
13. González Bueno A. Boticas y boticarios en el Madrid de 1812. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2013; 1: 111-130, 113.
14. Pelayo, R. El Museo de la Real Academia Nacional de Farmacia. Tesis doctoral, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid 2014, 110.
15. Gimeno Sieres E. Repertorio y análisis documental de las revistas españolas de farmacia y farmacología. Tesis doctoral, Departamento de Historia de la Ciencia y Documentación. Universidad de Valencia 2005.
16. González Bueno A. Un proyecto inacabado: La flora española del Colegio de Farmacéuticos de Madrid (1858). Homenaje a Pedro Sáinz Rodríguez. Madrid: Fundación Universitaria Española 1986; 321-329.
17. González Bueno A, Rodríguez Nozal R. En torno a la Flora Española: Dos proyectos fallidos en los años centrales del siglo XIX. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 1996; 54: 622-6.
18. González Bueno A. La botánica en la España de la segunda mitad del siglo XIX. *Zubía Instituto de Estudios Riojanos* 1997; 9: 29-44.
19. Rodríguez Nozal R. Orígenes, desarrollo y consolidación de la industria farmacéutica española (ca. 1850-1936). *Asclepio* 2000; LII-1: 127-59.
20. Hergueta PB. Relación de algunas plantas que vegetan en los Baños minerales de Segura, en Aragón, Partido de Montalbán, en la provincia de Teruel, 1860, Por D. Pascual B. Hergueta. *Naturales, espontáneas ó sin cultivo. El Restaurador Farmacéutico* 1866; 11: 85-86; 13: 101-102; 20: 158-159; 22: 172-173; 34: 269-270; 35 :279-280; 37: 292-294.
21. Hergueta PB. Nota manuscrita de Pascual Bailón Hergueta enviada al Colegio de Farmacéuticos de Madrid. 1858. Manuscrito conservado en el Archivo de la Real Academia Nacional de Farmacia. Leg. 102. Exp. 8. Doc. 1.
22. Delgrás M. Reorganización médica. *Boletín de Medicina, Cirugía y Farmacia* 1839; 6: 199-234, 274.
23. Hergueta, PB. Catálogo de las plantas que viven en el Partido Judicial de Molina de Aragón, recogidas, clasificadas y dispuestas por el método natural o de familias, por D. Pascual B. Hergueta. 1858. Manuscrito conservado en la Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia. Disponible en: (http://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1001176).
24. Hergueta PB. Subdelegación de Farmacia del Distrito de Molina, provincia de Guadalajara. *Boletín Oficial de la Provincia de Guadalajara* 1855; 129, viernes 26 de octubre, 2.
25. Archivo Municipal de Molina de Aragón. Acta de la visita de la botica de la Sra. Viuda de D. Ponciano Ramón García. Referencia 1881: 695-2/01.
26. Ayuntamiento de Tortuera. Partida de defunción. Libro del Juzgado Municipal de Tortuera, provincia de Guadalajara, Registro Civil, Sección Defunciones, 1896 Cuaderno 7ª, Folio nº 83.
27. Folch G. El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Discurso leído en la solemne sesión inaugural del curso 1976-77 el día 20 de enero de 1977 por Guillermo Folch Jou. Madrid: Real Academia de Farmacia 1977. pp. 65, 22.
28. Colegio de Farmacéuticos de Madrid. Lista General de los individuos que han sido admitidos en esta corporación, desde el día 21 de agosto de 1737 en que se instituyó por Real Cédula de Felipe V. Fechada a 21 de agosto de 1858.

29. Hergueta PB. Comunicado. Sr. Director de El Restaurador Farmacéutico. El Restaurador Farmacéutico, 1866; XXII: 295-296.
30. Abánades C. Hijos Ilustres de Molina y Pueblos de su Señorío. Trabajo inédito mecanografiado y manuscrito. Archivo Municipal de Molina de Aragón. s/f; 45.
31. Urquijo y Goitia JR de. La Revolución de 1854 en Madrid. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas 1984.
32. López Trujillo MA. ¡A cañonazos con los monumentos!: Los planes para destruir el Castillo de Molina de Aragón (1845-1860). Wad-Al-Hayara 2003; 30: 137-46.
33. Barra S. A cañonazos contra el castillo de Molina. La revista del fin de semana. El decano de Guadalajara. 2005; 4622: 10-20.
34. Rodríguez de Coro F. Guadalajara en el sexenio democrático (1868-1874). Wad-al-Hayara 1991; 18: 225-40.
35. Hergueta PB. Reseña física y natural de Molina de Aragón por D. Pascual Hergueta, farmacéutico en dicha ciudad y corresponsal del colegio de profesores de Madrid. El Restaurador Farmacéutico 1860; XVI: 20, 26, 28 y 32.
36. Calderón S. Existencia del Infralisiaco en España y Geología Fisiográfica de la Meseta de Molina de Aragón. Anales de la Sociedad Española de Historia Natural 1898; Serie II, tomo séptimo, XXVII: 180.
37. Caballero y Villaldea S. Flórua Arriacense. Estudio de las plantas que viven en la provincia de Guadalajara, con aplicación a la medicina, artes, industrias, agricultura y horticultura. Tomo II, Resumen histórico crítico de los trabajos botánicos Arriacenses desde el siglo XVIII a nuestros días. Guadalajara: Imprenta Gutenberg 1926; 215, 274.
38. Sanz y Díaz J. Los Aragonitos de Molina. Wad-al-Hayara: Revista de estudios de Guadalajara 1990; 17: 391-4.
39. Petavio D. Dogmata Theologica. Tomus Primus, lib. III, cap. III. Paris: Apud Ludovicum Vivès, Bibliopolam Editorem 1865.
40. Ajason de Grandsagné M. Histoire Natuielle de Pline. Traduction nouvelle. Tome septième, Paris: C.L.F. Panckoucke Éditeurs 1830.
41. Leclerc GL. Histoire Naturelle de Buffon, par René-Richard Castel. Nouvelle Édition, Tome IX. Paris: De L'imprimerie de Crapelet 1802.
42. Virey JJ. Histoire des mœurs et l'instinct des animaux. Tome second, Animaux sans vertèbres. Paris: Deterville Libraire 1822.
43. Hergueta PB. Exposicion fitográfica detallada de la Dedalera, con hoja de *Gordolobo* (*Digitalis Thapsii*, Linn) que habita en término jurisdiccional de Molina de Aragón. El Restaurador Farmacéutico 1865; XXI: 270-1.
44. Linneo C. Sistema de los Vegetables ó Resumen de la Parte Práctica de Botánica. Madrid: Imprenta Real 1788.
45. Hergueta PB. Variedades. Setas y Hongos. La Farmacia Española 1871; III: 688-90.
46. López de Amaya N. 571. Lista de las plantas del Señorío de Molina. Por *Lopez de Anaya (Nicolás)*, MS. del año 1781, conservado en el Jardín Botánico de Madrid, pliego y medio. Madrid: Catálogo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas I, 20, 3.15.
47. Hergueta PB. Sr. Director de La Farmacia Española. Comunicado que reproduce La Farmacia Española de Pascual Baylón Hergueta después del artículo, El Xanthium spinosum contra la rabia. La Farmacia Española 1876; VIII: 300-1.
48. Grzymala E. Des propriétés et de l'emploi du Xanthium spinosum contre la rage. Journal de Therapeutique 1876; 3: 529-531.
49. Fresquet JL. Adolphe Gluber y el Journal de Therapeutique (1874-1883). Asclepio 1993; XLV-2: 143-86.
50. The Sydney Morning Herald. A specific against Hydrophobia. 1876; Saturday, June, 24.
51. Annali Universali di Medicina e Chirurgia. Grzymala. Xanthium spinosum nella cura dell'idrofobia. 1876; 1 Ago, Serie I, volume 238, Fascicolo 8.
52. Annali Universali di Medicina e Chirurgia. Lo Xanthium spinosum come rimedio contro l'idrofobia. 1876; 1 Ott, Serie 3, volume 63, Fascicolo 4.
53. Scientific And Useful. Preventive of Hydrophobia. 1877; Volume III, Issue 133, 26 January: 7.
54. La Época. Según el doctor ruso Grzymala... . 1877; 7 de enero: 1.
55. Year Book of Pharmacy. *Xanthium Spinosum*. Dr. Grzymala. London: J.& A Churchill, 11, New Burlington Street 1877; 184-186.
56. Archivos sobre medicina homeopática. *Xanthium Espinosum* en la rabia. Barcelona, 1889; 36, de 30 de abril: 288.
57. Hergueta PB. Mas sobre el *Xanthium Spinosum*. La Farmacia Española 1876; 23, 8 de junio, Tomo VIII: 64.
58. Hergueta PB. Comunicado. Sr. D. Francisco Marín y Sancho. La Farmacia Española 1876; 24, 15 de junio, Tomo VIII: 382.
59. Pardo Sastrón J. Dos Palabras sobre el *Xanthium Spinosum*. Cachurrera menor. La Farmacia Española 1876; 24, año VIII, 15 de junio: 379-80.
60. Rodenisky. El *Xanthium spinosum*. El Anfiteatro Anatómico Español y El Pabellón Médico 1876; 83 de 30 de junio: 182.
61. Hergueta PB. Variedades. Contestación al doctor Rodenisky. La Farmacia Española; 1876; VIII: 455-8.
62. Pulido A. Suelto. Esperaba yo que si los debates periodísticos El Anfiteatro Anatómico Español y

- El Pabellón Médico 1876; 31 de julio: 210.
63. Hergueta PB. Comunicado. Sr. Director de La Farmacia Española. Sobre el asunto del doctor Rodenisky. La Farmacia Española 1876; VIII: 541-542.
 64. Pulido A. Suelto. Una galantería obliga a otra galantería ... El Anfiteatro Anatómico Español y El Pabellón Médico, 1876; 88, 15 de septiembre.
 65. Hergueta PB. Variedades. Réplica al doctor Pulido. La Farmacia Española 1876; VIII: 634-637.
 66. Pulido A. Réplica amistosa. Al Sr. D. P. Bailon Hergueta. El Anfiteatro Anatómico Español y El Pabellón Médico 1876; 90, 15 de octubre.
 67. Hergueta PB. Carta respetuosa y simpática al doctor don Angel Pulido y compañía. La Farmacia Española 1876; VIII: 681-683.
 68. Gómez Ortega C, Palau A. Curso Elemental de Botánica Teórico y Práctico dispuesto para la enseñanza del Real Jardín Botánico de Madrid. Madrid: Imprenta Real 1785.
 69. Gómez Ortega C. Curso Elemental de Botánica. Parte teórica y parte práctica. 2ª ed. Madrid: Imprenta de la viuda e hijo de Marín 1795.
 70. Cutanda V. Flora Compendiada de Madrid y su Provincia o Descripción sucinta de las Plantas Vasculares que espontáneamente crecen en este territorio. Madrid: Imprenta Nacional 1861.
 71. Richard A. Elementos de Botánica. Traducido al español de la 4ª ed. francesa por D. Pedro Felipe Monlau. Tomo Primero. Barcelona: Imprenta de José Rubio 1831.
 72. Texidor y Cos J. Flora Farmacéutica de España y Portugal. Madrid: Imprenta de José M. Ducazcal 1871; 296 y ss.
 73. De Candolle AP. Théorie Élémentaire de la Botanique. París: Déterville 1819: 239.
 74. Lázaro e Ibiza B. Botánica descriptiva. Compendio de la Flora Española. Tomo I. Madrid: Librería de la Viuda de Hernando y Compañía 1896.
 75. Hergueta PB. Flora Molinesa. Manuscrito conservado en la Real Academia de Farmacia. Biblioteca. Madrid 1858.
 76. Hergueta PB. Relación de las plantas que viven en los Baños de Segura en Aragón, clasificadas por el sistema sexual del caballero Carlos Linneo y por el método natural de Jussieu, De Candoll y otros. 1860. Manuscrito conservado en la Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia. Disponible en: (http://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1001175).
 77. Hergueta PB. Cuatro Palabras de un suscriptor. El Restaurador Farmacéutico 1845; tomo I. (No ha sido posible su consulta).
 78. Hergueta PB. Remitido. El Restaurador Farmacéutico 1846; II: 268-268.
 79. Hergueta PB. Análisis del manantial minero-medicinal de Molina de Aragon, practicado por el licenciado en farmacia D. Pascual Bailon Hergueta. El Restaurador Farmacéutico 1846; II: 43-44.
 80. Hergueta PB. Aclaración a varias reales órdenes, que se han dictado para unificar el ejercicio de la Farmacia. El Restaurador Farmacéutico 1851; VII: 20.
 81. Hergueta PB. Sobre honorarios a los peritos farmacéuticos en las causas criminales. El Restaurador Farmacéutico 1851; VII: 35-36.
 82. Hergueta PB. Sobre ajustes. El Restaurador Farmacéutico 1851; VII: 128-129.
 83. Hergueta PB. Mesas terremótico-giratorias. El Restaurador Farmacéutico 1853; IX: 20.
 84. Hergueta PB. Sección Editorial. La Sanidad pública ante las demás ramas de la administración. El Restaurador Farmacéutico 1861; XVII: 17-18.
 85. Hergueta PB. Sección Editorial. Consideraciones sobre la suerte de las clases médicas en los servicios que prestan al público y al Gobierno. El Restaurador Farmacéutico 1861; XVII: 53-54.
 86. Hergueta PB. Sección Editorial. Sobre el apoyo de las autoridades a los asuntos sanitarios. El Restaurador Farmacéutico 1861; XVII: 97.
 87. Hergueta PB. *et al.* Excmo. Sr. Gobernador de Guadalajara. La España Médica, Iberia Médica y Crónica de los Hospitales, 1861; 296, 1 de agosto: 482.
 88. Hergueta PB. Contradicción del Gobierno sobre subastas de medicamentos. El Restaurador Farmacéutico 1862; XVIII: 41 (no ha sido posible su consulta).
 89. Hergueta PB. Sección Varia. Muestra de deferencia al - Vigía de los partidos-. El Genio Quirúrgico 1864; 10, 1, 429: 107-109.
 90. Hergueta PB. Comunicado. Sr. Quintín Chiarlone, director de El Restaurador Farmacéutico. El Restaurador Farmacéutico 1865; XXI: 127-128.
 91. Hergueta PB. Sección Editorial. A mis comprofesores los farmacéuticos de Castilla la Nueva. El Restaurador Farmacéutico 1865; XXI: 185-187.
 92. Hergueta PB. Sección Varia. Comunicado. Sr. Director del Restaurador Farmacéutico. El Restaurador Farmacéutico 1865; XXI: 223-224.
 93. Hergueta PB. Sección Varia. Dos palabras. El Restaurador Farmacéutico 1865; XXI: 247.
 94. Hergueta PB. Sección Varia. A los farmacéuticos de partido. El Restaurador Farmacéutico 1866; XXII: 70-71.
 95. Hergueta PB. Una observación más sobre aglomeración de boticas en una misma localidad. El Restaurador Farmacéutico 1866; XXII: 239-240.
 96. Hergueta PB. ¿?. El Restaurador Farmacéutico 1866; XXII: 415-416 (no ha sido posible su consulta íntegra).
 97. Hergueta PB. A mis ajustados. El Restaurador Farmacéutico 1870; XXVI: 431.

98. Hergueta PB. Los caciques. La Farmacia Española 1871; III: 278-279.
99. Hergueta PB. Remitido (1). Salus populi. La Farmacia Española 1871; III: 292-293.
100. Hergueta PB. Dos palabras sobre igualas y arreglo de partidos. La Farmacia Española 1876; VIII: 259-261. Artículo similar (92).
101. Hergueta PB. *Surgamus, qui dormimos* (I). La Farmacia Española 1876; VIII: 406-407.
102. Castel, C. Descripción Física, Geognóstica, Agrícola y Forestal de la Provincia de Guadalajara. Del Boletín de la Comisión del Mapa Geológico de España. Madrid: Imprenta y Fundición de Manuel Tello 1881; 46.
103. Hergueta PB. Reseña física y natural de Molina de Aragón. Folleto en 8º, de 16 páginas. Madrid 1860. (No ha sido posible su consulta).
104. Colmeiro M. Enumeración y revisión de las plantas de la Península Ibérica Hispano-Lusitana é Islas Baleares. Con la distribución geográfica de las especies, y sus nombres vulgares, tanto nacionales como provinciales. Tomo I. Madrid: Imprenta de la viuda é hija de Fuentenebro 1885; CLV y 24.
105. Colmeiro M. Enumeración y revisión de las plantas de la Península Ibérica Hispano-Lusitana é Islas Baleares, Con la distribución geográfica de las especies, y sus nombres vulgares, tanto nacionales como provinciales. Tomo III. Madrid: Imprenta de la viuda é hija de Fuentenebro 1887: 439.
106. Pensado JL. Idea de un diccionario de la Lengua Gallega. En Opúsculos lingüísticos gallegos del siglo XVIII. Fundación Penzol. Vigo: Ed. Galaxia 1974; 89, 235.
107. Pardo Sastrón J. Relacion (por orden alfabetico) de algunas plantas que vegetan en los baños minerales de Segura, en Aragon, provincia de Teruel, año 1860, Por D. Pascual B. Hergueta. Naturales, espontaneas ó sin cultivo. 1867. Manuscrito. Archivo de José Pardo Sastrón, Jardín Botánico de Valencia.
108. Jaime Lorén JM. Documentos del archivo de J. Pardo Sastrón en el Jardín Botánico de Valencia: Textos científicos. Flora Montiberica 1998; 9: 1-12.
109. Herrera Casado A. Molina de Aragón. Veinte siglos de historia. Guadalajara: AACHE Ediciones 2000; 86.
110. Cirujano S, Medina L. Plantas acuáticas de las lagunas y humedales de Castilla-La Mancha. Madrid: Real Jardín Botánico (CSIC), Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha 2002; 85.
111. Medina L. Flora y Vegetación acuáticas de las lagunas y humedales de la provincia de Guadalajara (Castilla-La Mancha). Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Sección de Biología. Madrid 2003; 6, 92, 387.



Counterfeit medicine. A threat to health. Legal situation

Title in Spanish: *El medicamento falsificado. Una amenaza para la salud. Situación legal*

Carlos del Castillo Rodríguez^{1,*}, María Jesús Lozano Estevan

¹Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

ABSTRACT: The existence of substandard, spurious, falsely labelled, falsified and counterfeit (SSFFC) medical products is an unacceptable risk to public health, becoming an emerging problem in recent years. However, we should be aware that the phenomenon of counterfeiting is not a novelty since such practice coexists with human beings since time immemorial. In the present work we will do a partial analysis of counterfeiting situation from a legislative point of view and will analyze how various legal and non-legal instruments have been used trying to resolve this issue in the European context.

RESUMEN: La existencia de medicamentos falsificados es una realidad. Se trata de un problema emergente en los últimos años. Sin embargo, hemos de ser conscientes que el fenómeno de la falsificación no es un hecho novedoso ya que tal práctica convive con el ser humano desde tiempos pretéritos. En el siguiente texto se realizará un análisis parcial de la situación de los mismos desde su punto de vista legislativo y se analizará cómo se han utilizado diversas herramientas jurídicas y no jurídicas para intentar solventar esta problemática existente a nivel comunitario.

*Corresponding Author: carlcast@ucm.es

Received: November 20, 2015 Accepted: December 14, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 329-333

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Medicines are medical products subject to state intervention in all their phases (1), being multi-dimensional products (2). According to Valverde (3): "there must be a need of moving towards a free global movement of medicines taking into account the specific problems of developing countries". The legal regulation of medicines can not be understood without a detailed regulation of persons, both natural and legal persons involved in the circulation and supply of medicines (4).

Nowadays, worldwide, there is an irregular supply of medicines. This activity is a great threat that has to be controlled by the public administration as guarantor of citizens' rights.

We should understand that the movement of counterfeit medicines is an emerging problem in both developed and developing countries. Although in Spain the distribution chain is secure, health authorities should be alert to the emergence of possible counterfeit medicines, especially sold online through websites. The community pharmacist occupies the best position to exercise pharmacovigilance and detection activities of counterfeit medicines since at present there is a large number of consumption in developed countries due to the population's feeling of insecurity.

Although health authorities in developed countries had proved the existence of spurious/falsely-labelled/falsified/ and counterfeit medicines, they thought they could only be

purchased by users via Internet. There was no evidence that might be found in legal distribution channels, at least in the European Union.

However, in 2007, the British health authorities detected more than two million doses of Zyprexa imported, nearly half of them were acquired by patients. This medicine did not contain the doses indicated in its fact sheet (5).

For this reason, and given the health alert that occurred, it was decided to regulate/change urgently issues related to distribution and import of medicines in the European Union in order to ensure proper distribution channel of the medicines

2. SITUATION OF COUNTERFEIT MEDICINES IN SPAIN

After the need of promulgation of Royal Decree 1/2015, of July 24, amending law of guarantees and rational use of medicines and health products (6), it has been set a clear and necessary definition of counterfeit medicine. The mentioned Act defines counterfeit medicine as: "Medicines that are deliberately and fraudulently mislabelled with respect to:

1. ° Its identity, including packaging and labeling, name or composition in regard to any of its components, including excipients and the dosage of those ingredients;

2. ° its source, including the manufacturer, country of manufacturing, country of origin and the holder of the marketing authorization; or,

3. ° its history, including records and documents in relation with the distribution channels used."

This problem is by no means trivial. The existence of counterfeit medicines is not new. There is plenty of historical data (7) demonstrating the use of these medicines since time immemorial. It is true that this problem has lived with human beings from almost its origin, but the most significant rise has occurred in the last forty years when population started to consume medicines, most of time, almost everyday.

For this important reason, several European institutions enacted different guidelines that were transposed into Spanish law in relation to our Constitution in the field of health protection, preventing the entry of these medicines into the legal distribution channel. The European Commission noticed the growing dimension of this problem and, during the first months of 2008, made an inquiry about the key ideas to better protect patients against the risk of counterfeit medicines publishing in December 2008 a proposal amending Directive 2001/83/EC as regards the prevention of the entry into the legal supply system of medical products which are falsified in relation to their identity, history or source.

The Commission made a proposal to amend pharmaceutical legislation (8) against counterfeit medicines in order to prevent the spread of these through the legal supply system. For this, the Commission introduced additional guidelines related to products, in particular on safety features for medicines subject to prescription; new rules regarding distribution and import of medicines and active pharmaceutical ingredients (API's); and rules regarding the quality of manufacturing and the authenticity of the mentioned API's.

On the other hand, it should be noted the importance of Directive 2011/62/EU (9) amending Directive 2001/83/EC (10) that established a European code relating to medical products for human use, as regards the prevention of the entry of counterfeit medicines in the legal supply system.

This new European directive had as its main purpose to stop the massive emergence of counterfeit medicines in the European Union in both illegal, in most cases, and legal (11) channels including a definition of counterfeit medicine and making in-depth analysis on rational use of medicines and their distribution within the Union European in order to prevent the proliferation of counterfeit medicines.

However, we should be aware of the existence of other "non-legislative" weapons that enable the eradication of this phenomenon at least in Spain and, consequently, on many occasions, in the European Union. From our point of view, health workforce education is the most essential component for health promotion in most constitutions worldwide.

It is desirable to emphasize the importance of health workforce education in connection with counterfeit medicines. The health workforce education is defined by the World Health Organization as "a set of information and

education activities that encourage people to enjoy good health, to know how to attain it, to do everything as possible individually and collectively in order to maintain health and to ask for help if needed."

Furthermore, this definition could be extended, from our point of view, considering the Spanish legal system, specifically to Law 44/2003, of 21 November, on Health Profession (12) Planning which highlights the educational role that health professionals should have with their patients.

We have abovementioned the existence of several initiatives both from a legislative and non-legislative point of view used by authorities and health professionals to try to partially eradicate the proliferation and development of the problem of counterfeit medicines both in legal and illegal distribution channels.

The aim of this work is not to describe in detail the methods and initiatives of combating the rapid rise; however, we would like to show some of them due to the importance they have had in the possible modification of both Spanish and EU regulation.

The first initiative we would like to emphasize is the National Strategic Plan 2012-2015 for medicines coordinated by the Spanish Medicine Agency's and Health Products. This initial strategy was articulated as a response from all sectors involved in order to shield the pharmaceutical channel against attempts to introduce counterfeit medicines.

After the term of the previous strategy (2008-2011) and after the approval of Directive 2011/62/EU, a new overall Strategic Plan, with the same principles as the previous strategy, was designed; however, this new one raised new performances based on the changes in recent years in order to strengthen their effectiveness. The main objective is to protect the health of patients preventing them from consuming counterfeit medicines.

Secondly, we would like to indicate that group IMPACT (The International Medical Product Anti-Counterfeiting Task Force) published a document entitled "Anti- counterfeit Technologies for the Protection of Medicines". This work shows the various technologies available to, to the extent possible, try to alleviate the proliferation of counterfeit medicines (13).

Finally, and from a more global perspective, we highlight the publication in 2014 of the document entitled National Guidelines for Pharmacists by the International Pharmaceutical Federation (FIP) in order to combat counterfeit medicines and provide member institutions a plan to facilitate the development of a national guideline for pharmacists on counterfeit medicines (already done, as stated above, in Spain both in 2007-2011 and 2011-2015).

In the first part of the mentioned guideline different definitions of counterfeit medicines and their extension to counterfeit medical devices are reviewed; and it also includes an analysis of the extent of the problem from an international perspective. Then, the document provides a list of thirty-two medicines most likely to be adulterated,

and reviews the consequences for personal and public health. Furthermore, this document also provides a tool for visual inspection to facilitate the detection of counterfeit medicines.

It is true that the occurrence of such medicines has considerably increased in recent years due to the emergence of new technologies that allow the purchaser/patient buying medicines through telematics channels. In many of these cases, the purchaser ignores the existing rules on the sale of such products and because both the comfort of acquiring them and the anonymity that occurs in this purchase, he/she prefers to use this channel without being aware that most of the time he/she is buying a counterfeit medicine. It is for this reason that European health authorities have tried to stop this indiscriminate selling enabling pharmacies legally established to sell online some medicines that before patients only could buy in the pharmacy.

However, at present the society is fully linked due to the rapid expansion of the Internet phenomenon that provides users large amounts of information, sometimes excessive, and allows the purchase of products through the network.

Consequently, this outrageous commercialism has caused the sale of different types of goods, including medicines. This fact has led to a regularization of the market to try to eradicate criminal acts.

Moreover, in the field of European Public Health it is worth noting the full respect of the European authorities on the responsibilities of Member States for the organization and delivery of health services, such as pharmaceutical services. We must be aware that pharmacies are health institutions (private property and public interest) (14) and in Spain are distributed following a demographic and geographical (15) criterion ensuring access to medicines to almost the entire population (16). In Spain dominates the so-called "Mediterranean model" pharmacies which enables citizens a high degree of accessibility to medicines.

However, given the massive proliferation of illegal sale of medicines (counterfeit and unauthorized) to the public through Internet and with the objective of public protection and risks' reduction, the Royal Decree 870/2013 was approved, regulating the online selling of non-prescription medicines (17) to the public and regulating also the Law 29/2006 of July 26 on sale of medicines for human use through websites for later publishing a single text (Royal Legislative Decree 1/2015 of 24 July that approves the revised text of the law on guarantees and rational use of medicines and health products) which encompasses most part of the comprehensive regulation on abovementioned medicines.

On the other hand, it should be noted that in Spain the sale of medicines are also done by post (18). However, this fact is not similar to the one of selling medicines online. The Spanish Constitutional Court allowed this type of sale (19) under strict conditions.

BAES says that allowing the sale of prescription medicines by post and telematic procedures to specific patients, does not mean that it is possible to dispense these medicines outside the official circuit and for this reason, the Court strengthens the essential role of health professional.

It is clear that the main aim of the promulgation of the Royal Decree was to strengthen the telematic channel in order to make it safer when dispensing medicines. However, we should notice that only, at least in Spain, may be online dispensed non-prescription medicines of human use following industrial manufacturing.

As regards online sale of non-prescription medicines, Spanish legislation protects the rational use of medicines, establishing a series of guarantees to ensure that the supply and demand of medicines is done from a health public interest facility, as in the case of the pharmacy, and with the performance of a skilled professional, both health and scientifically, of medicines as pharmacists.

The second Additional Provision and sole Transitional Provision of the mentioned Royal Decree show that pharmacies before starting distance selling of non-prescription medicines for human use manufactured industrially through websites (20) must, firstly, have been published a common logo on the website, and secondly be running the websites of the Spanish Agency for Medicines and Health Products and the competent authorities of the Autonomous Communities.

Pharmacies interested in telematics selling shall send their notifications to the competent authorities of their autonomous region, so that the latter will be able to implement their websites.

In addition, pharmacies should inform about the beginning of their telematics activity, data on pharmaceutical holder of the pharmacy that offers such a service, and the date of the beginning of the activity, web address and should describe the procedures for sending the patient medication.

However, pharmacies that plan to provide this service must be aware that it is a "virtual" extension thereof. Consequently, the pharmacist must perform the legal and ethical measures that regulate their professional work in the field of medicines dispensation. They should also meet a number of requirements described below.

Firstly, as we have showed in the previous paragraphs, they can only perform this service, pharmacies which have been legally authorized prior notification of such activity to the competent authority of the Autonomous Community in which it is located. Orders are directly made to the pharmacy through the web address given and it can not offer or link to self-medication or self-diagnostic tools that avoid the obligatory advice of the pharmacist.

Secondly, dispensing can be only made by a pharmacist, prior personalized advice, located in a pharmacy legally established and without the involvement of intermediaries.

Thirdly, it may occur that the buyer is located in

another Member State of the European Union. In this case, the sale must follow the Spanish law, as well as the enforceable one in the country of destination.

On the other hand, it is important to highlight the problems that may arise at the time of the medicines delivery. The pharmacist in charge of dispensation of medicines is the person responsible of this expedition which may only be sent from the pharmacy responsible for the dispensation, indicating, among others, data and expenses of mailing, and the address.

It is also important that after delivering the medicine in the address where the user has indicated, refunds are not permitted unless the medicines have been delivered by mistake, do not correspond with the order or have been damaged during the transport.

With regard to means of payment, the web can offer different ways according to the needs of the author. These means can be: a) credit/debit card; b) bank transfer; c) payment gateways; d) cash on delivery payment.

In addition, we should consider that when dispensing non-prescription medicines, the pharmacist is using Internet technology. Consequently, he/she must know that such mean facilitates the transmission of information and transactions but at the same time it is important to know that this is a mean that requires the development and use of a series of measures to take advantage of all abilities it can eventually provide.

On the one hand, pharmacies should have a technology infrastructure (hardware and software) for dispensing non-prescription medicines for human use through websites. In addition, the infrastructure developed for the website of the pharmacy must ensure the availability of services offered during the period established for it, as well as an adequate level of usability, presenting structured information so that it offers easy, intuitive and fast navigation.

The records of purchases and forms exchanged between the user and the pharmacy during the purchase process should be stored in a secure system that guarantees that the information is kept for a minimum period of two years (the maximum required by law).

The information used in dispensing through websites of non-prescription medicines for human use is related to the user's health. For this reason there must be included security measures described in Royal Decree 1720/2007 (21), of 21 December, which approves the Regulation implementing Organic Law 15/1999, of 13 December (22), on the Protection of Personal Data. It is also recommended conducting a daily backup of the system and of the users and purchases data recorded on the web. Thus, the legal compliance of service record will be guaranteed for at least two years against possible failures.

All these requirements are not a simple list of exigencies to enable the performance of these services. It is an effective and safe way to ensure users/patients the accessibility to non-prescription medicines for human use through Internet and to regulate exhaustively this sale to

deal with the problem of illegal purchase of medicines through telematics channels that in many cases are the entry mechanism of the reported counterfeit medicines.

3. CONCLUSION

The counterfeiting of medicines is a major problem worldwide, affecting in varying degrees to all countries. Adequate legislation and clear definition concerning counterfeit medicine is necessary. Today we need a harmonized at international level in terms of definition of counterfeit medicine, although various attempts to carry out coordination at the local level to be necessary to ensure adequate regulation, control and research. There are several initiatives at both international and European Union level to eradicate counterfeit drugs. In this paper we have analyzed European standards and the various national and international strategic plans that have been established to try to resolve this emerging problem.

In our view, it is necessary to provide more information to patients and healthcare professionals about the risk involved in the use of these drugs. It is essential to raise awareness of irrigation there to buy drugs by telematics ways, since there is a possibility that they are false.

4. REFERENCES

1. Bombillar Sáenz F.M. Intervención administrativa y régimen jurídico del medicamento en la Unión Europea. Tesis doctoral. Granada: Universidad de Granada 2010.
2. Valverde J.L. Challenges Faced by Drugs in Current Society. *Leadership Medica* 1999; 20: 44-57.
3. Valverde J.L. Bases para un estatuto jurídico mundial de los medicamentos. In: Barranco Vela, R, Bombillar Sáenz F. El acceso al medicamento. Retos jurídicos actuales, intervención pública y su vinculación al derecho a la salud. Granada: Comares 2011; pp.13-14.
4. Zamora H, Granda E, González C. Cómo están contempladas las garantías de abastecimiento. In: García, M. Curso básico de Derecho farmacéutico. Madrid: Ed. Instituto de Legislación farmacéutica S.L. 2014; pp.326-333.
5. On line: <http://www.noticias-medicas.com/items/view/16179>. [Date of research: June 23rd 2015].
6. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. *Boletín Oficial del Estado*, 25 de julio de 2015, n. 177.
7. OMS. Medicamentos falsificados. Pautas para la formulación de medidas para combatir los medicamentos falsificados. On line: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2968s/>
8. Online: <http://register.consilium.europa.eu/pdf/es/09/st16/st16>

- [055.es09.pdf/](#). DG CIA. November 24th 2009. 16055/99, pp. 1-10.
9. Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea L 311 de 28 de noviembre de 2001, p.67.
 10. Directiva 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 8 de junio de 2011 que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal. Diario Oficial de la Unión Europea L 174/74 de 1 de julio de 2011.
 11. There are important legislation about definition of Counterfeit Medicines but, nowadays in Spain the most important and the newest is the Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado, 25 de julio de 2015, n. 177.
 12. Ley 44/2003, de 21 de noviembre, de ordenación de las profesiones sanitarias. Boletín Oficial del Estado, de 22 de noviembre de 2003, n. 280.
 13. Lage Dávila, A. Global Pharmaceutical Development and Access: Critical Issues of Ethics and Equity. MEDICC Review 2011; 13(3):16-22.
 14. Art. del Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado de 25 de julio de 2015, n. 177.
 15. There is a different legislation about this topic: Decreto de 24 de enero de 1941, Real Decreto 909/1978, de 14 de abril por el que se regula el establecimiento, la transmisión de las oficinas de farmacia y Ley 16/1997, de 25 de abril de Regulación de Servicios de las Oficinas de Farmacia.
 16. On line:
[\[http://static.correofarmaceutico.com/docs/2015/05/12/estadisticas_farmacia.pdf\]](http://static.correofarmaceutico.com/docs/2015/05/12/estadisticas_farmacia.pdf).
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2014). Estadísticas de colegiados y farmacias comunitarias. En línea: [Date of research: June 29th 2015].
17. Real Decreto 870/2013, por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica. Boletín Oficial del Estado, de 9 de noviembre de 2013, n. 269, pp. 90156-90163.
 18. Baes, C. La venta de medicamentos por internet: un nuevo reto para los Estados miembros de la Unión Europea. In: Barranco Vela R, Bombillar Sáenz F. El acceso al medicamento. Retos jurídicos actuales, intervención pública y su vinculación al derecho a la salud. Granada: Comares 2010; pp. 163-188.
 19. Judgment 152/2003 in which the Law on Pharmacy of Galicia that allows dispensing by pharmacies, the chronically ill, at home, using mail or courier is declared valid prescription and provided there a previous dispensation in the pharmacy.
 20. The European Commission has adopted an implementing regulation - in accordance with the Directive on Counterfeit Medicines (2011/62 / EU) - which establishes the design of a common logo for pharmacies wishing to dispense drugs and the Internet technical requirements to ensure its authenticity; besides member states may impose certain conditions and limitations in this regard, while meeting minimum Community requirements established.
 21. Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Boletín Oficial del Estado, de 19 de enero de 2008, pp. 4103-4136.
 22. Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Boletín Oficial del Estado, de 14 de diciembre de 1999, n. 298, pp. 43088-43099.



Pirfenidone experience in mild-to-moderate idiopathic pulmonary fibrosis in a general hospital

Title in Spanish: *Experiencia con pirfenidona en fibrosis pulmonar idiopática leve-moderada en un hospital general*

Javier Martínez-Moreno^{1*}, José Manuel Ventura-Cerdá¹, Alfonso Ángel López Navarro¹, Ana Cristina Cercos Lletí¹, Susana Herrera Lara², Mónica Climente Martí¹

¹Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Dr. Peset. ²Servicio de neumología. Hospital Universitario Dr. Peset

ABSTRACT: This article presents the experience and outcomes of patients treated with pirfenidone. FVC and DLCO parameters during 12 months were collected in patients treated with pirfenidone. Eight of the ten patients continued treatment until month 12. 7 patients presented at 12 months an adequate response treatment, 1 patient did not achieve therapeutic targets established (improvement or stability). At week 52, our patients had a mean of change in FVC(%) of $-2.38 \pm 6.93\%$; patients of clinical trials showed -5.2% and -8.3% treated with pirfenidone and placebo respectively. Higher incidence of adverse effects was observed than clinical trials. Our results show that pirfenidone is a well-tolerated drug, whose toxicity can be controlled by dose adjustment, and it is effective in mild-moderate IPF. Due to no proven effectiveness and safety in medium / long term and the high economic impact, it is necessary to identify those patients who may get more clinical benefits.

RESUMEN: Este artículo presenta la experiencia y los resultados de pacientes tratados con pirfenidona. Se obtuvieron parámetros de FVC y DLCO durante 12 meses en pacientes tratados con pirfenidona. Ocho de los diez pacientes continuaron el tratamiento hasta el mes 12. 7 pacientes presentaron a los 12 meses un tratamiento de respuesta adecuada, 1 paciente no logró objetivos terapéuticos establecidos (mejoría o estabilidad). En la semana 52, nuestros pacientes tenían una media de cambio en FVC(%) de $-2.38 \pm 6.93\%$; los pacientes de los ensayos clínicos demostraron -5.2% y -8.3% tratados con pirfenidona y placebo respectivamente. Se observó mayor incidencia de efectos adversos de los ensayos clínicos. Nuestros resultados muestran que pirfenidona es un fármaco bien tolerado, cuya toxicidad puede ser controlada mediante el ajuste de la dosis, y es eficaz en IPF de leve a moderada. Debido a la no probada eficacia y seguridad a medio/largo plazo y alto impacto económico, es necesario identificar a aquellos pacientes que pueden obtener mayores beneficios clínicos.

*Corresponding Author: e-mail: javigarvi@gmail.com

Received: December 24, 2015 Accepted: February 4, 2016 Language of Manuscript: English

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 334-337

1. BACKGROUND

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial chronic pulmonary disease, which affects patients older than 50 years old. Disease aetiology is unknown, but has been associated with risk factors such as tobacco consumption, viral infections, environmental pollution, drug and genetic predisposition (1-2). Estimated incidence varies between 7 and 16 cases/100000 inhabitants/year, with a prevalence ranging between 14 and 43 cases/100000 inhabitants (3).

IPF is characterized by an abnormal histopathological mesenchymal cell proliferation, fibrosis, overproduction and disorganized collagen deposition, extracellular matrix changes with distortion of pulmonary architecture and appearance of subpleural cysts (honeycomb cysts), with accumulation of myofibroblast and fibroblast (3-5). In early stages, clinical pattern is similar to other lung diseases; signs and symptoms is unproductive cough,

fatigue, eosinophilia, clubbing and increased acute phase reactants.

There is no clear consensus about patients' classification. The mild, moderate and severe terms are used depending on symptoms and function tests, although only mild-to-moderate IPF has been characterized (Forced Vital Capacity (FVC) $\geq 50\%$, Diffusion of Carbon Dioxide (DLCO) $\geq 35\%$ (6)). Despite the mild diagnosis, medium-term prognosis is poor, with a median survival between two and four years after diagnosis. Respiratory failure is the most common cause of death (40%). Other causes of death in patients with IPF include heart failure, ischemic heart disease, infection, and pulmonary embolism. Age under 50 years, female gender, preserved lung function and increased proportion of lymphocytes (20-25%) in bronchoalveolar fluid have been associated with more survival (7). Age over 70 years, Comorbidities (pulmonary hypertension), emphysema and lung cancer), DLCO under 40%, FVC decrease $\geq 10\%$ and DLCO decrease $\geq 15\%$

(percentage of predicted) at 6-12 months, desaturation during (Six Minute Walk Test) $6MWT \leq 88\%$ and extension of the fibrosis in HRCT (High Resolution Computed Tomography) were associated with worst prognosis (6).

The therapeutic approach aims to preserve lung function and reduce the inflammatory component of the disease. Pirfenidone is an antifibrotic agent that inhibits the transforming growth factor beta (TGF- β), increasing the synthesis of collagen, decreasing extracellular matrix and blocking the proliferation of fibroblasts. It is indicated for the treatment of mild-moderate IPF (FVC > 50%, DLCO > 35%). The clinical efficacy of pirfenidone has been studied in three studies in Phase 3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled patients with IPF, which has shown a 30% improvement versus placebo in the FVC (8,9).

2. OBJECTIVE

To describe the main clinical outcome in patients mild-moderate IPF treated with pirfenidone after a year of monitoring follow-up the therapeutic protocol established in the hospital.

3. METHOD

When pirfenidone was available for clinical practice in our hospital, Pneumology and Pharmacy departments reached an agreement about the use of pirfenidone, demarcating clinical conditions that must be met to start the treatment. The pirfenidone-use criteria for a new patient was: diagnosis of mild-moderate IPF (forced Vital Capacity (FVC) >50% and diffusion of Carbon Dioxide (DLCO) >35%, age <80 years, charlson index <3 (excluding age), absence of severe renal impairment (ClCr <30 ml/min), absence of acute liver failure, advanced fibrosis, cirrhosis or hepatocellular carcinoma, no hypersensitivity to pirfenidone and no significant drug interactions (no administered with fluvoxamine, grapefruit juice or other inhibitors of cytochrome P450 1A2 and rifampicin, snuff or other inducers of cytochrome P450 1A2). Patients starting treatment between January and March 2014 were chosen. A monitoring program was established during the first year of treatment which included lung function and biochemical study at months 1, 4, 8 and 12 from the beginning. The main clinical outcome was evaluated by the response; at month 12 was considered as positive when FVC and DLCO were increased from baseline, and was considered stable when FVC and/or DLCO do not decrease more than

10% and 15% from the baseline respectively. Withdrawal criteria were established when FVC and/or DLCO were reduced more than 10% and 15% respectively (All reductions were considered absolute from the baseline value). All patients were treated with an oral pirfenidone increasing-dose schedule: induction dose of 267 mg (1 pill) each 8 hours during the first week, 534 mg (2 pill) each 8 hours during second week, and maintenance dose of 801 mg (3 pills) each 8 hours from the third week if adequate tolerance.

From electronic clinical records, were obtained: demographic data, FVC, DLCO, date of start of treatment, dosage and adverse effects experienced. From pharmacy record were obtained dispensed pills. Adherence was computed as percentage of dispensed pills with respect to theoretical total pills must be taken during follow up period. Cost of pirfenidone was calculated as acquisition hospital costs at December 31, 2014.

4. RESULTS

Ten patients (9 males) with mild IPF met the criteria for starting treatment. The mean age was 69.5 ± 5.0 years and the average time from diagnosis to starting treatment with pirfenidone was 2.7 ± 1.8 years (range 1-7 years). Seven patients received N-acetylcysteine as a pretreatment. Until the time of marketing, all treatments initiated were authorized by the Agencia Española del Medicamento (AGEMED) and processed as "foreign drugs". Eight of the ten patients continued on treatment until month 12. One patient died a month after starting treatment for not related lung pathology reasons. One patient discontinued pirfenidone in the eleventh month due to adverse effect (severe tremor). According with established criteria, 7 patients presented at month twelve a positive response, and only one patient did not achieve therapeutic targets established (improvement or stability) and treatment was changed to nintedanib at 12th month from the beginning. Mean baseline of FVC and DLCO were $85.3 \pm 15.4\%$ and $55.6 \pm 16.7\%$ respectively. Figure 1 compares our population with the results published in the clinical trials (8-9); at week 52 (12 months), our patients had a mean change in FVC (%) of $-2.4 \pm 6.9\%$ versus -5.2% reported on clinical trials in the pirfenidone group (-8.3% with placebo). Table 1 shows FVC and DLCO results at 12th month and response for each patient.

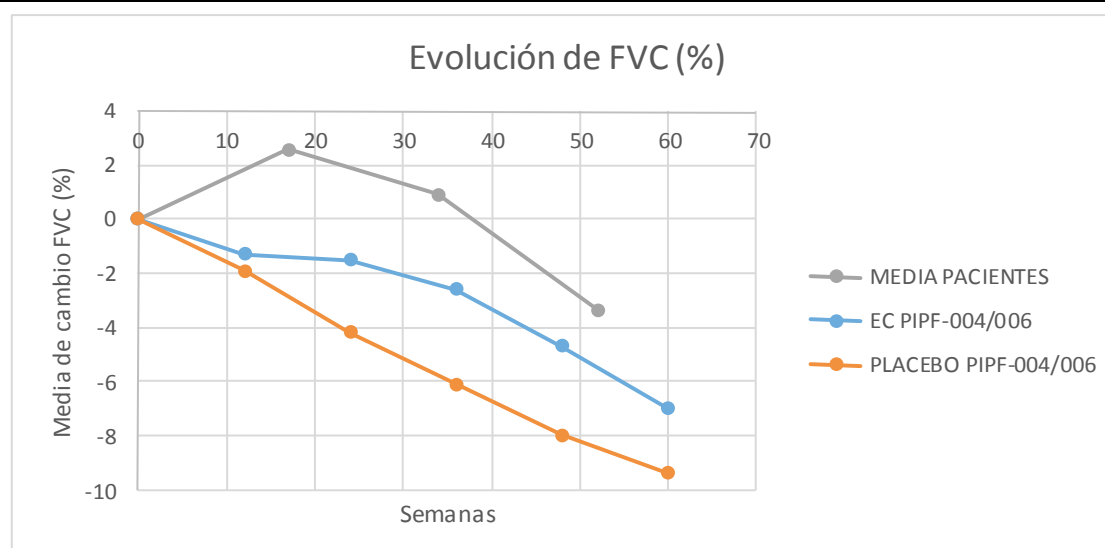


Figure 1. Comparison of mean change in FVC (%) of our sample of patients with clinical trials.

Table 1. FVC and DLCO change from baseline at the end of follow up period (month 12 from start) and response.

Patient number	change FVC(%)	Change DLCO(%)	Response at the end of follow up period (12 months)
1	-7	1	WITHDRAWAL AT 11TH MONTH (ADVERSE EFFECTS: TREMOR)
2	-13	-11	WITHDRAWAL AT 12TH MONTH. CRITERIA NON COMPLETED.
3	-7	-8	POSITIVE RESPONSE
4	-2	3	POSITIVE RESPONSE
5	-8	-10	POSITIVE RESPONSE
6	Not lung-related death		
7	1	-2	POSITIVE RESPONSE
8	7	-5	POSITIVE RESPONSE
9	-3	-6	POSITIVE RESPONSE
10	6	-11	POSITIVE RESPONSE

The most common adverse reactions in our patients were nausea 18%, asthenia 22%, dyspepsia 19%, dizziness 18%, photosensitivity 12% and joint pain 10%; in clinical trials were nausea 40%, asthenia 20%, dyspepsia 30%, dizziness 40%, photosensitivity 40% and joint pain 10%. All patients showed any adverse effect. In all cases were mild or moderate severities. Higher incidence of adverse effects was observed than clinical trials reported. However, none of the patients experienced a significant increase of liver enzymes. In four patients pirfenidone dose was reduced due to adverse effects (All cases with reduction to 534 mg/8hours as maintenance dose); 3 patients showed gastrointestinal intolerance and 1 patient showed photo-toxicity.

Treatment adherence was 100% according to pharmacy records and considering dose reductions. At full dose, cost per patient and year was 30563€. Total cost per response was 37233€.

5. DISCUSSION

Our study population data compared to clinical trials show that pirfenidone had an effectiveness about 50% higher with a higher incidence of adverse effects than in clinical trials which in all cases were mild or moderate severities. With our small population study can not be compared with the clinical trials, but suggest a good handling of the drug by the multidisciplinary clinical team. Therefore, pirfenidone showed effectiveness and was well tolerated in clinical practice for patients with mild-moderate IPF within a twelve months follow up period where adverse effects can be controlled by dose adjustment. However, either in clinical trials or in our experience, results cannot be extrapolated to longer periods of time according with the course of the illness, where final outcome variables as survival, quality of life or functional status are more relevant than changes in FVC or DLCO. It is also necessary to observe results of

effectiveness and toxicity in the longer term. Taking into account high cost of pirfenidone, will be necessary perform economic evaluations in order to identify those patients that reach a greater clinical benefit with the lower cost possible. This type of analysis is necessary if we consider the availability of alternative therapy (nintedanib) for the same clinical objective.

6. CONFLICT OF INTEREST

None.

7. REFERENCES

1. Du Bois RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, et al. Ascertainment of individual risk of mortality for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011; 184(4): 459-66.
2. Naik PK, Moore BB, Viral infection and aging as cofactors for the development of pulmonary fibrosis, *Expert Rev Respir Med*. 2010 Dec; 4(6): 759-71.
3. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. [Am J Respir Crit Care Med](#). 2011 Mar 15; 183(6): 788-824.
4. Homer RJ, Elias JA, Lee CG, Herzog E. Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011; 135(6): 780-8.
5. Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 174(6): 654-8.
6. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Bronconeumol*. 2013; 49(8):343–353
7. García CZ, Díez J de M, Walther RÁ-S. *Patología respiratoria: manual de tratamientos*. Gráf. Enar; 2009. 374 p.
8. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*. 2011; 377(9779): 1760-9.
9. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2014; 370(22): 2083-92.



Tuberculosis is not an illness of the past

Title in Spanish: *La tuberculosis no es una enfermedad del pasado*

Carmen Avendaño¹

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

ABSTRACT: The search for a cure for tuberculosis throughout history has been menaced by the increasing number of people with HIV and the continuous appearance of antituberculosis drug resistance. The development of diagnosis procedures, vaccines and drugs is updated in this review, emphasizing the methods to overcome resistances, the mechanisms of drugs action, and the best known or more vulnerable targets.

RESUMEN: La búsqueda de una cura para la tuberculosis a lo largo de la historia se ha visto amenazada por la explosión del número de enfermos de VIH y la aparición continuada de resistencias a los fármacos antituberculosos. En esta revisión se comenta el desarrollo de distintos métodos de diagnóstico, vacunas y fármacos, haciendo énfasis en los modos de superar las resistencias, los mecanismos de acción de los fármacos, y las dianas más conocidas o más vulnerables.

*Corresponding Author: avendano@farm.ucm.es

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

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 338-356

Language of Manuscript: Spanish

1. LA BÚSQUEDA DE UNA CURA PARA LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias, fundamentalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) o bacilo de Koch. Éste se caracteriza por poseer una cubierta cérea, formada fundamentalmente por ácidos micólicos, que lo protege de los agentes externos (Figura 1).

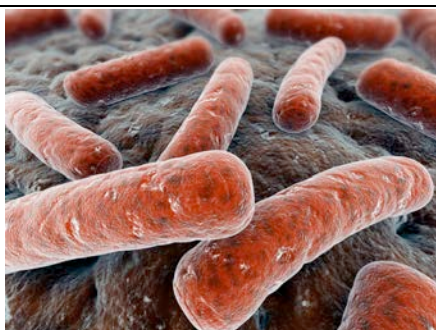


Figura 1. Aspecto exterior de *M. tuberculosis*.

Al complejo *Mycobacterium tuberculosis* pertenecen también *M. africanum* que produce la tuberculosis humana en África, *M. microti* que produce la tuberculosis en ratas silvestres, *M. canetti* capaz también de producir tuberculosis en humanos y *M. bovis* que infecta al ganado bovino y a distintos animales domésticos y silvestres, infectando al hombre a través de la ingestión de productos crudos contaminados como la leche o por inhalación (1). A estas especies se suman al menos otras sesenta micobacterias oportunistas, no tuberculosas, capaces de causar enfermedades en humanos (2).

El término tuberculosis (TB) se acuñó por primera vez por Johann Schönlein en 1839 para referirse a aquellos casos de tisis (TB pulmonar) en los que se observaban tubérculos, pequeños tumores duros que se forman cuando el sistema inmune construye una pared alrededor de la bacteria en los pulmones. La TB pulmonar puede diseminarse de los pulmones a los riñones, la columna vertebral y el cerebro, y se transmite generalmente por inhalación o ingestión de gotas infectadas. La infección de otros órganos puede producirse por distintas vías de transmisión y ofrecer diversos cuadros clínicos. Esta enfermedad ha hecho estragos desde tiempos prehistóricos, evidenciándose la presencia de lesiones en huesos humanos del Neolítico incluso en América (3). Se estima que el mayor porcentaje de población afectada transcurrió en los últimos años del siglo XVIII y a lo largo del XIX.

La tuberculosis se conoció con los nombres de consunción o tisis desde que Hipócrates (460-370 a. J.C) y la escuela de Kos establecieron este concepto para un proceso morboso causado por la supuración de úlceras pulmonares y caracterizado por caquexia progresiva, tos, hemoptisis, etc. Este cuadro englobaba realmente a todas las infecciones pleuropulmonares cronicadas. Los hipocráticos pensaban que la naturaleza dispone de recursos curativos, y el médico sólo debe evitar todo lo que pueda entorpecer esta acción. Por ello, la ausencia de excesos (incluidos los sexuales), el reposo prolongado, y una alimentación equilibrada, se consideraban fundamentales. La intervención activa incluía la práctica de sangrías para descongestionar de sangre pútrida el pulmón enfermo, la toraconcentesis con lancetas para drenar el líquido situado entre la pleura y la pared torácica,

la aplicación de cataplasmas, la inhalación de vapores de sandácara (una resina obtenida del enebro y otras coníferas), la instilación de vino aguada en la tráquea para provocar accesos de tos, etc.

En el siglo II d.J.C., Galeno intuyó que la tisis era contagiosa (Aristóteles lo supuso con anterioridad) y comprendió que el reposo del pulmón afectado era esencial para su curación, recomendando la administración de mezclas de plantas con propiedades balsámicas o sedantes de la tos. Los viajes por mar y la estancia en climas secos se consideraban muy beneficiosos. Durante la Edad Media, se inició la "cura por el toque real", un privilegio que se siguió practicando hasta comienzos del siglo XIX y que dispensaban algunos reyes para curar ciertas enfermedades sobre todo la escrófula, la forma más frecuente de infección extra-pulmonar de la tuberculosis diseminada por vía linfática que cuando coloniza los ganglios cervicales provoca unas úlceras características o "escrófulas". En esta práctica el rey imponía las manos sobre el enfermo diciendo: "El rey te toca y Dios te cura". En los primitivos hospicios-hospitales se daba gran valor a la administración de leche mezclada con sal y miel, mientras que los árabes recomendaban la infusión azucarada de pétalos de rosas.

En el Renacimiento se utilizaron toda clase de plantas balsámicas y expectorantes entre las que se incluía la pulmonaria, recomendada por Paracelso por su semejanza con la forma de un pulmón. En el siglo XVI, Jerónimo Fracastoro intuyó que la tisis y otras enfermedades se contagiaban por la acción de gérmenes que penetraban en el organismo con la respiración, y posteriormente se absorbían y transportaban por la sangre hasta las vísceras. En los siglos XVI y XVII, el azufre, el arsénico y los mercuriales, así como todo tipo de plantas procedentes del Nuevo Mundo (como la quina, el té, el cacao y el tabaco), se utilizaron sin ningún resultado práctico, pero en el siglo XVIII se redactaron en algunas ciudades de España e Italia normas profilácticas como las ordenanzas reales promulgadas por Fernando VI en 1751, que incluían la declaración obligatoria de los casos, el aislamiento de los enfermos, y la enajenación y quema de los objetos personales de los fallecidos. En el resto de Europa eran pocos los que creían que la tisis era una enfermedad contagiosa, por lo que estas ordenanzas se derogaron tras las conquistas napoleónicas. Por estas fechas, la tisis se conoció como plaga blanca por la palidez de los pacientes, y como enfermedad de los artistas por el aspecto etéreo y pálido del enfermo, que representaba la renuncia de lo mundano que caracterizó al romanticismo.

La demostración de que la tuberculosis era inoculable, realizada por el médico francés Villemin en 1865, y el aislamiento y cultivo de los bacilos responsables de la enfermedad por R. Koch entre los años 1880 y 1882 (4), hicieron posible que se catalogara definitivamente como enfermedad infecto-contagiosa, se desvaneciera la leyenda romántica en torno a ella, se asociara su propagación a la pobreza e insalubridad que caracterizaban a las ciudades europeas y norteamericanas de esa época, y se sentaran las

bases de la lucha antituberculosa. La importancia de esta lucha se refleja en la abundante literatura que trata de la búsqueda de una cura para la tuberculosis (5).

A pesar de estos avances se siguieron utilizando medicamentos de lo más diverso e ineficaz, como el arsénico, el tanino, el yodo, las inhalaciones de alquitrán, la creosota, e incluso el alcohol, poniéndose de moda largas estancias en ciudades como Roma o Venecia porque se consideraba a la malaria (habitual en dichas ciudades) una enfermedad antagónica de la tisis.

Los centros para curas de reposo, descritos magistralmente en la novela de Thomas Mann "La Montaña Mágica", se multiplicaron a partir de los años 1860 y fueron la mejor alternativa al tratamiento hasta el advenimiento de la quimioterapia, sobre todo en las fases iniciales de la enfermedad. Los buenos resultados que producían se atribuyen hoy a que la nutrición equilibrada y la exposición gradual a la luz solar colaboraban a restablecer los niveles de vitamina D, esencial para la función de los macrófagos, mientras que el reposo en cama junto al ejercicio moderado favorecían la perfusión pulmonar en las áreas cavitadas (6).

En 1890 Koch propuso la administración por vía inyectable de un derivado purificado de antígenos de *M. tuberculosis* al que se denominó tuberculina, que perseguía acelerar la respuesta inmune activando la formación de anticuerpos específicos y reforzar las defensas normales del organismo atacado mediante la intensificación de la respuesta inflamatoria en las lesiones tuberculosas. Esta "vacunación activa" se generalizó en Europa y Estados Unidos, donde se utilizaron gran variedad de preparados y de pautas de administración. Aunque estos tratamientos demostraron finalmente ser ineficaces contra la enfermedad, fueron útiles para el diagnóstico de la TB latente mediante el test de Mantoux. La tuberculina también ha inspirado algunas inmunoterapias, como la inoculación de *Mycobacterium vaccae*, una especie no patogénica de la familia de las *Mycobacteriaceae* que viven naturalmente en el suelo (7), y la vacuna RUTI® (8).

Hacia 1930 la tuberculosis pulmonar se había convertido en una enfermedad quirúrgica debido al incesante desarrollo de nuevas técnicas, comenzando por la práctica de neumotórax terapéuticos. El italiano Carlo Forlanini, basándose en estudios previos de Toussaint que demostraban la buena evolución de las lesiones tuberculosas cuando se producía un neumotórax espontáneo, practicó en 1888 el primero de estos neumotórax mediante la punción con una aguja de la cavidad pleural y la introducción de nitrógeno. En la misma época, el cirujano norteamericano J. B. Murphy realizaba experiencias similares, utilizando un grueso trócar que introducía por una incisión en la cavidad torácica. El colapso pulmonar favorecía los procesos de cicatrización de una manera más evidente que todos los procedimientos anteriormente ensayados, y la colapsoterapia adquirió rápidamente una gran importancia. En 1907, Friedrich practicó las primeras toracoplastias con extensas resecciones costales que alteraban la estructura

torácica y producían una mortalidad elevada, pero después se comprobó que se obtenían buenos resultados con toracoplastias parciales menos agresivas.

En 1920 el microbiólogo A. Calmette y su ayudante, el veterinario C. Guérin, consiguieron una especie bacilar de origen bovino y de escasa virulencia capaz de desarrollar cierto grado de inmunidad activa frente a la tuberculosis (ver el apartado 3). La vacuna BCG que desarrollaron fue la gran esperanza para muchos; sin embargo, pese a su amplia difusión, ha pasado en la actualidad a un segundo término ante el poderoso impacto de la quimioterapia moderna, que comenzó en 1929 con el descubrimiento de la actividad antibacteriana de la penicilina por A. Fleming.

Las aproximaciones quimioterápicas empezaron a generalizarse en los años 1920 con la administración de sales de oro, que se utilizaron hasta la llegada de la estreptomycinina en 1945. Debido a que parte de los pacientes tuberculosos pueden curarse espontáneamente, incluso aquellos con frotis de esputo positivos al microscopio, la eficacia de los tratamientos antituberculosos fue difícil de determinar antes del establecimiento de los ensayos clínicos controlados. Esto explica que se utilizaran durante varios años algunas sales de oro antes de que se demostrara su ineficacia (9).

En 1942 se descubrió que ciertas sulfonamidas, especialmente promizol, eran capaces de matar micobacterias (10) y en 1952, tres compañías farmacéuticas: Bayer en Alemania y Hoffman La Roche y Squibb en los Estados Unidos, descubrieron la actividad “milagrosa” en el tratamiento de la tuberculosis de la isoniazida (INH), un fármaco que ya se conocía en 1912. Desgraciadamente, como ocurre con todos los antituberculosos, pronto se desarrollaron resistencias. Igual ocurrió con la estreptomycinina (SM), un antibiótico aislado por Selman A. Waksman de cultivos del hongo *Streptomyces griseus*, activo pero tóxico para el nervio auditivo. Si se administraba en solitario, muchos enfermos reactivaban sus lesiones al cabo de pocos meses de aparente curación debido a la habilidad que posee *Mtb* para desarrollar cepas mutantes resistentes a la acción de este antibiótico. Afortunadamente, la administración conjunta de SM y ácido *para*-aminosalicílico (PAS, aislado en 1944) (11) minimizó este problema (12), y finalmente se estableció como el mejor tratamiento una terapia triple que incluía también INH. La mayor desventaja de esta terapia triple era su larga duración, necesaria para poder asegurar la esterilización de todos los reservorios bacilares y la no recurrencia de la infección. En este aspecto se llegó a un consenso de 18 meses continuados de tratamiento, aunque muchos médicos opinaron que al menos debería durar 2 años o incluso toda la vida (13).

Paralelamente, durante la década de los años 50 se fueron descubriendo algunos fármacos activos frente a *Mtb*, aunque ninguno superó la eficacia de la combinación INH, SM y PAS. Entre ellos se encuentran pirazinamida (PZA), viomicina, cicloserina, terizidona, kanamicina (a partir de la cual se desarrolló amikacina), capreomicina,

etionamida y protionamida. En 1961 se introdujo etambutol (EMB), aunque su eficacia se vio comprometida por su gran toxicidad óptica (14).

En 1957 se aisló de una muestra de suelo la bacteria *Streptomyces mediterranei* (ahora denominada *Amycolatopsis mediterranei*), que producía varios compuestos con actividad antibacteriana denominados rifamicinas. Un derivado semisintético de rifamicina S denominado rifampicina (RMP), obtenido en 1966 por Pietro Sensi, demostró una extraordinaria actividad por vía oral contra todas las poblaciones de *Mtb* y se incluyó por la OMS entre los 5 fármacos esenciales en la tuberculosis. Esta actividad se complementa con la de la pirazinamida (PZA), específica contra los bacilos intracelulares. Así surgieron las pautas cortas de quimioterapia que duran seis meses.

El prolífico desarrollo de las fluoroquinolonas comenzó en 1962 cuando Leshner y colaboradores descubrieron accidentalmente que el ácido nalidíxico, un producto secundario en la síntesis del antimalárico cloroquina, tenía actividad antibacteriana (15). Desarrolladas para el tratamiento de otras infecciones, las fluoroquinolonas se introdujeron después en el tratamiento de tuberculosis resistentes (16).

2. LA EXPLOSIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA TUBERCULOSIS

Debido a que la existencia de un sistema inmune eficaz en el huésped es crucial en la erradicación de las formas latentes en las que el bacilo evade o atenúa la inmunidad, la tuberculosis es un gran problema en los enfermos de SIDA. Hacia 1990, la devastadora interacción entre ambas infecciones causó una explosión de la incidencia de la tuberculosis en todo el mundo, acompañada de la rápida aparición de nuevas resistencias. En el año 2008 por ejemplo, enfermaron 11,5 millones de personas de las que murieron 1,9 millones. Un tercio de la población mundial presenta actualmente infección tuberculosa latente (ITL), y esta situación puede afectar también a las terapias que inhiben la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso de terapias biológicas en el tratamiento de la artritis reumatoide aumenta la incidencia de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, por lo que es importante realizar un estudio previo al inicio del tratamiento para identificar a los pacientes con tuberculosis latente y disminuir el riesgo de reactivación de la enfermedad (17).

Hoy existen cepas de *Mtb* resistentes a múltiples fármacos (MDR-TB), especialmente a los fármacos de primera línea más efectivos como isoniazida y rifampicina, y cepas extensamente resistentes a fármacos (XDR) que representan un 95% de los casos de MDR-TB y son insensibles a rifampicina, isoniazida, fluoroquinolonas y, al menos, a uno de los fármacos inyectables amikacina, kanamicina y capreomicina. El espectacular incremento de las resistencias a fármacos ha puesto de manifiesto que no se puede bajar la guardia y que, para poder afrontar con garantías el reto de la lucha contra la tuberculosis en el

siglo XXI, es necesario un mayor esfuerzo económico destinado a la investigación de nuevos fármacos y de vacunas por parte de los países desarrollados. En el caso de Europa, el 85% de todos los nuevos casos de tuberculosis y las tasas más altas de MDR-TB se dan en Armenia, Azerbaiyán, Bielorrusia, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazajistán, Kirguistán, Letonia, Lituania, República de Moldavia, Rumanía, Federación de Rusia, Tayikistán, Turkmenistán, Turquía, Ucrania y Uzbekistán. La “Nueva Estrategia Final Mundial contra la Tuberculosis” y el “Plan de Acción Consolidado del Defensor Europeo” han manifestado recientemente que esta situación requiere innovaciones para un diagnóstico rápido y el acceso a nuevos tratamientos antituberculosos seguros y eficientes.

La OMS estimó que en 2013 se contagiaron 9.000.000 de personas, entre ellas 360.000 europeos (unos 1.000 cada día), y que 1,5 millones murieron a causa de la enfermedad. De estas muertes, más del 95% tuvieron lugar en países de ingresos bajos o medianos y 38.000 se produjeron en Europa. Datos semejantes se publicaron en 2014, por lo que la OMS aprobó en mayo de ese año una ambiciosa estrategia que abarca un periodo de 20 años (2016-2035) en la que se fijan objetivos y se perfilan distintas medidas para poner fin a esta epidemia. Así pues, aunque el número de enfermos tuberculosos va disminuyendo lentamente a nivel mundial, la tuberculosis no es una enfermedad del pasado.

3. DIAGNÓSTICO

La técnica habitual para el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (ITL) es la prueba de la tuberculina (PT), llamada también test de Mantoux (18). Tras la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD), esta prueba pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad previo del organismo frente a dicha sustancia (en Europa se utiliza el derivado PPD RT23). El principal inconveniente de esta prueba radica en que las proteínas utilizadas no son específicas de *M. tuberculosis*, sino que están compartidas con otras micobacterias no tuberculosas y por *M. bovis*, hecho que disminuye su especificidad.

En los últimos años se han investigado y aprobado nuevos métodos diagnósticos basados en la cuantificación in vitro de la respuesta inmune celular, los llamados *interferon gamma release assays* (IGRA), que detectan la liberación en sangre de interferón gamma en respuesta a antígenos tuberculosos específicos y pueden complementar la PT. Esta detección se realiza por ensayos de inmunoenzimas o determinando el número de manchas que representan la huella de un linfocito T individual secretor de interferón. La FDA aprobó el año 2001 *QuantiFERON-TB*, que detecta la liberación de interferón gamma en respuesta a PPD. El año 2004 aprobó *QuantiFERON-TB Gold*, más específica porque utiliza como antígenos péptidos sintéticos que simulan antígenos codificados por *M. tuberculosis* y ausentes en *M. bovis* BCG y en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas. En 2007 aprobó

QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-GIT, Cellestis®), que incorpora un antígeno micobacteriano adicional. *T-SPOT.TB* (Immunotec®) es otra prueba diagnóstica desarrollada en Gran Bretaña (19). El diagnóstico de la tuberculosis es todavía inadecuado, especialmente en los pacientes con HIV, por lo que se siguen desarrollando nuevas tecnologías (20).

Para el seguimiento de la tuberculosis pulmonar suelen analizarse los cambios de apariencia que se observan en el pulmón por rayos X y la presencia de bacterias en las flemas, mientras que la sospecha de una infección de TB extrapulmonar se confirma generalmente con tomografía computerizada, resonancia magnética de imagen, análisis de sangre y orina, punción lumbar, o biopsia.

4. VACUNAS

En la década de los años 1880, Louis Pasteur descubrió que la virulencia de un microbio vivo podía atenuarse para producir vacunas, empezando por el cólera y siguiendo con la rabia y el ántrax. En 1908 se utilizaron estas técnicas para crear una vacuna contra la tuberculosis. Albert Calmette y Camille Guérin, tras observar que el crecimiento de *Mycobacterium bovis* en bilis de buey disminuía su virulencia, comprobaron que 230 pases seriados de un único aislado clínico eran suficientes para que los bacilos perdieran su capacidad de producir una tuberculosis fatal en diversos animales. Estos bacilos atenuados, a los que hoy se sabe que les faltan más de cien genes, inducían una infección limitada y una resistencia parcial a la reinfección con *M. tuberculosis* y *M. bovis* virulentos. La vacuna se denominó primeramente Bacille Bilie (de bilis) Calmette et Guérin, después Bacille Calmette Guérin, y finalmente vacuna BCG. A partir de 1921 comenzó a administrarse a bebés y niños, a los que protegía aparentemente con pocos efectos secundarios. A finales de 1929 y comienzos de 1930 ocurrió un grave accidente en Lubeck (Alemania), donde se administraron por error *Mtb* virulentos a más de 200 bebés. De ellos murieron 72 y la mayor parte de los restantes desarrolló tuberculosis, pero BCG superó este error y ha sido la vacuna más utilizada hasta el momento en todo el mundo. En España se administra una única dosis a los recién nacidos, cuando resulta más eficaz.

Aunque la vacuna BCG es todavía la única disponible para la tuberculosis, la inmunidad inducida que produce no evita que se pueda establecer la infección del bacilo tuberculoso, aunque sí la retrasa, y no es posible potenciar esta protección con una segunda dosis. Estos inconvenientes justifican el hecho de que desde hace más de 20 años se investiguen diferentes vacunas (21). Según Mangtani, la evaluación de cualquier nueva vacuna para la tuberculosis debe tener en cuenta que, lo mismo que ocurre con la vacuna BCG, una infección previa puede enmascarar o bloquear sus efectos (22). Hoy se sabe que los manósidos de fosfatidil-miioinositol (PIM), que son muy abundantes en el bacilo Calmette Guérin y en la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, son agonistas de los receptores TLR2 (*Toll-like receptor 2*) implicados en la

respuesta inmune innata, activando a los macrófagos para que segreguen TNF- α (23).

Más de una docena de nuevas vacunas para la tuberculosis se han estudiado clínicamente o han entrado en ensayos clínicos (24). Entre ellas se encuentra MVA85A (*modified vaccinia Ankara 85A*), que utiliza virus vacuna modificados genéticamente y produce una inmunidad más prolongada que la vacuna BCG, aunque algunos resultados clínicos han sido bastante desalentadores (25). La vacuna MTBVAC (*Mycobacterium tuberculosis vaccine*) es una cepa viva atenuada a partir de un aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa Mt103). En esta cepa se han deletado por técnicas de ingeniería genética dos genes esenciales para la virulencia de la bacteria: el gen *phoP* y el gen *fadD26*, por lo que estas mutaciones cumplen con los requisitos esenciales que tiene que tener una vacuna viva para que sea segura en humanos. En los ensayos preclínicos en ratones y cobayas, MTBVAC demostró la misma seguridad y los mismos perfiles de distribución que la vacuna clásica BCG, confiriendo una mayor protección frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Su descubridor, el Prof. Carlos Martín Montañés (responsable del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza), consiguió ayudas estatales y privadas con las que se patentó MTBVAC en el año 2007, y posteriormente se consiguió una inversión adicional de 1.000.000 € a fin de desarrollar la tecnología necesaria para generar la vacuna. En el año 2009, la empresa CZ Veterinaria se interesó por el proyecto, lo cofinanció y creó la filial Biofabri para producir la vacuna si ésta llegaba a aprobarse. Tras comenzar los ensayos clínicos de seguridad en adultos (Fase 1) se preveía que pronto pudieran comenzarse los ensayos de seguridad en recién nacidos (26), pero estas perspectivas se vieron afectadas por los recortes de financiación realizados para salir de la crisis económica actual y, por el momento, su desarrollo requiere encontrar otras fuentes de financiación. En una situación semejante se encuentra otra potencial vacuna española para la tuberculosis, denominada RUTI®, que comentaremos seguidamente.

Además de estudiar vacunas preventivas más eficaces que BCG se desarrollan vacunas inmunoterapéuticas para ser administradas a individuos que padezcan TB activa en combinación con fármacos antituberculosos, a fin de acortar la duración de los tratamientos y reducir la recurrencia de la enfermedad.

Uno de los grandes problemas de la tuberculosis es el enorme reservorio existente de *Mtb*. Actualmente se calcula que alrededor de 2.000.000.000 de personas tienen una infección latente y que esta cifra se incrementará en un 50% el año 2020. Según la llamada “hipótesis dinámica” *Mtb* no está “dormido”, sino en lucha constante con el sistema inmune del huésped, de forma que el 10% de estas personas acabará finalmente desarrollando la enfermedad debido a una reacción inflamatoria muy intensa que incrementa el tamaño de las lesiones. Como ya hemos comentado, el problema es especialmente importante en

personas infectadas por VIH, para las que la OMS recomienda que reciban un ciclo de nueve meses de tratamiento preventivo con isoniazida. Estas personas no sólo tienen problemas para mantener la adhesión a un ciclo de tratamiento tan prolongado, sino que también pueden sufrir toxicidades hepáticas sobre todo si están tratadas simultáneamente con fármacos antivirales. Por ello, sería preferible una terapia preventiva de menor duración.

La vacuna RUTI®, cuya fórmula se patentó en 1998 por microbiólogos del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, conocido como Can Ruti, está basada en fragmentos de células de *M. tuberculosis* cultivados en condiciones de estrés. Induciendo una respuesta equilibrada de tipo Th1/Th2/Th3 contra antígenos de bacilos en estado latente, esta vacuna permite evitar la inmunodepresión en el hospedador infectado y tratado con una pauta de quimioterapia corta. Tras demostrar su eficacia en modelos experimentales con ratones, se iniciaron los ensayos clínicos en colaboración con Archivel Farma, una *spin off* creada en el año 2000 (27). En el año 2011 esta vacuna superó los ensayos realizados en Sudáfrica con 98 personas afectadas por tuberculosis y sida, pero su desarrollo se detuvo en 2011 por razones económicas. El equipo investigador trata en la actualidad de comercializar el probiótico Nyaditum Resae® (NR), basado en el cultivo de la nueva especie *Mycobacterium manresensis* descubierta en el río Cardener (28). Desarrollado por la *spin-off* Manremyc con investigadores de la Unidad Experimental contra la Tuberculosis (UTE) del Instituto Germans Trias i Pujol (IGTP) dentro de la UAB, este preparado actúa modulando el sistema inmune del huésped, “educándolo” para que no considere al bacilo como un peligro sino como un alimento. Por ser un probiótico, NR no está sujeto a las estrictas regulaciones de los fármacos y ya está disponible en el mercado.

Según los expertos, el desarrollo de vacunas contra la TB es un proceso tan complicado y dilatado en el tiempo que ningún país o institución podrían afrontarlo en solitario. Organizaciones como *Stop TB Partnership*, *Tuberculosis Vaccine Initiative*, o *AERAS Global TB Vaccine Foundation*, promueven la investigación de nuevas vacunas seguras y eficaces. Algunas de ellas tienen como base células enteras de micobacterias, mientras que otras contienen antígenos de *Mtb* expresados como proteínas recombinantes formuladas con adyuvantes o presentados en vectores virales. El principal problema encontrado hasta el momento es que los datos inmunológicos de los estudios preclínicos no suelen concordar con los resultados clínicos por la falta de modelos adecuados y por la necesidad de desarrollar biomarcadores que permitan evaluar su eficacia. La ausencia de éstos dificulta muchísimo la selección en una fase temprana y la evaluación clínica acelerada de los candidatos a nuevas vacunas. A pesar de las dificultades, se espera que las nuevas vacunas para prevenir la infección, la enfermedad o su recurrencia, contribuyan en

Tuberculosis is not an illness of the past

gran medida a la eliminación de la tuberculosis en el año 2050.

5. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Actualmente, los fármacos antituberculosos (normalmente expresados con 3 letras o con una sola letra) se clasifican por su eficacia y potencia en 5 grupos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en su aplicación clínica. Los de 1ª línea (grupo 1), donde se encuentran los fármacos orales isoniazida (H/INH), rifampicina (rifampina en EEUU) (R/RMP), pirazinamida (Z/PZA), etambutol (E/EMB), rifapentina (P/RPT) y rifabutina (RFB), se recomiendan en las infecciones de *Mtb* no resistentes combinando 4 de ellos, generalmente rifampicina, etambutol, pirazinamida, e isoniazida durante

2 meses, seguido de un tratamiento adicional con rifampicina e isoniazida durante otros 4 meses (Figura 2).

El tratamiento de la MDR-TB es más complejo y requiere generalmente el uso de más de cuatro fármacos de 2ª línea (grupos 2, 3 y 4) durante unos 20 meses, con frecuencia fluoroquinolonas, amikacina, kanamicina y capreomicina (29). Estos fármacos suelen ser más tóxicos y mucho más caros que los de 1ª línea (30). En el grupo 2 se encuentran los antibióticos aminoglicósidos estreptomycin (S/STM), kanamicina (KM) y amikacina (AMK) y los polipéptidos capreomicina (CM) y viomicina (VIM), todos ellos inyectables (Figura 3).

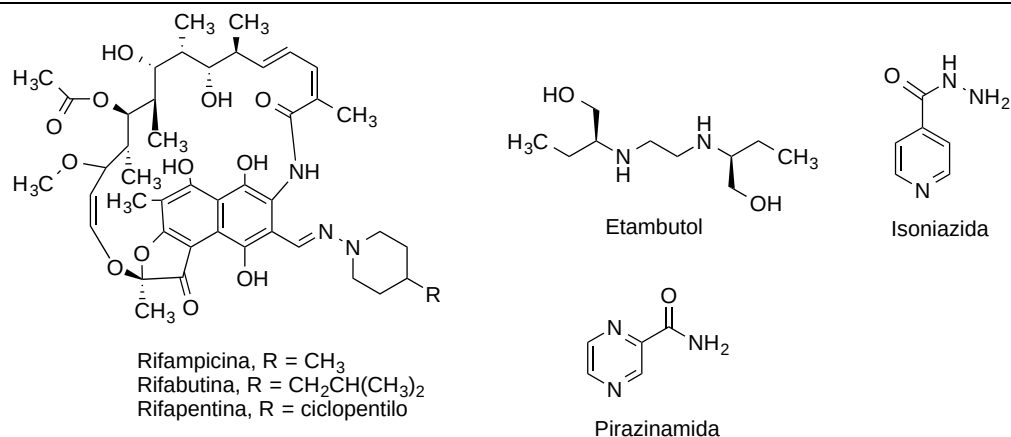


Figura 2. Antituberculosos del grupo 1.

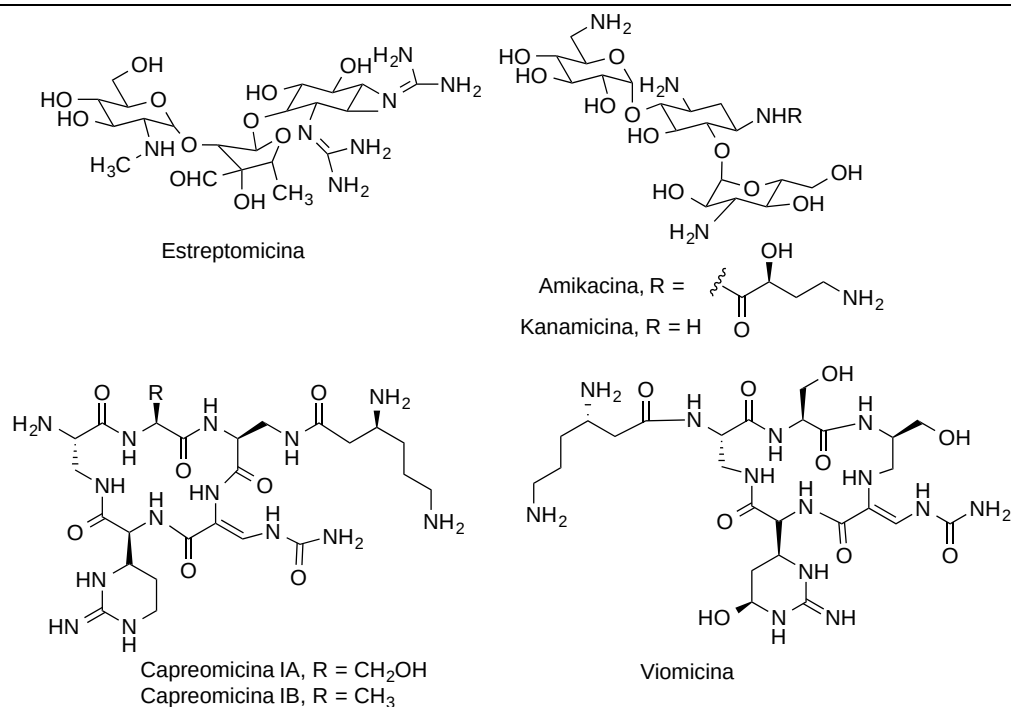


Figura 3. Antituberculosos del grupo 2.

En el grupo 3 se encuadran las fluoroquinolonas orales o inyectables ciprofloxacino (CFX), levofloxacino (LFX),

moxifloxacino (MFX), ofloxacino (OFX) y gatifloxacino (GFX) (Figura 4).

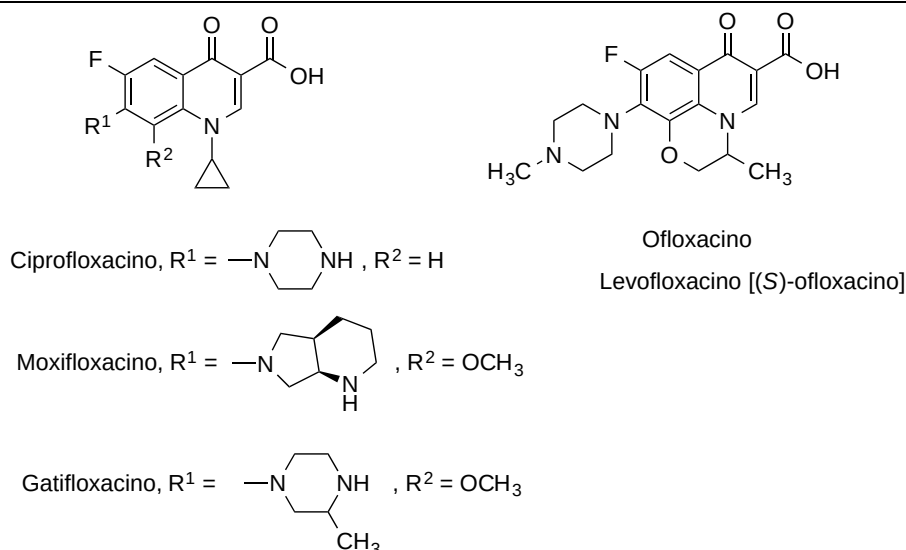


Figura 4. Antituberculosos del grupo 3.

En el grupo 4 se incluyen ácido *p*-aminosalicílico (PAS), cicloserina (CS), terizidona (TRD), etionamida (ETH), protionamida (PTO), tioacetazona (THZ) y linezolid (LZD), todos ellos fármacos orales (Figura 5).

Linezolid (Zyvox®) fue el primer antibiótico sintético de acción sistémica. Comercializado por Pfizer, inhibe la síntesis proteica al fijarse al sitio P (23s) de la subunidad ribosomal 50s. Terizidona (Terizidex®) es un análogo de cicloserina (31).

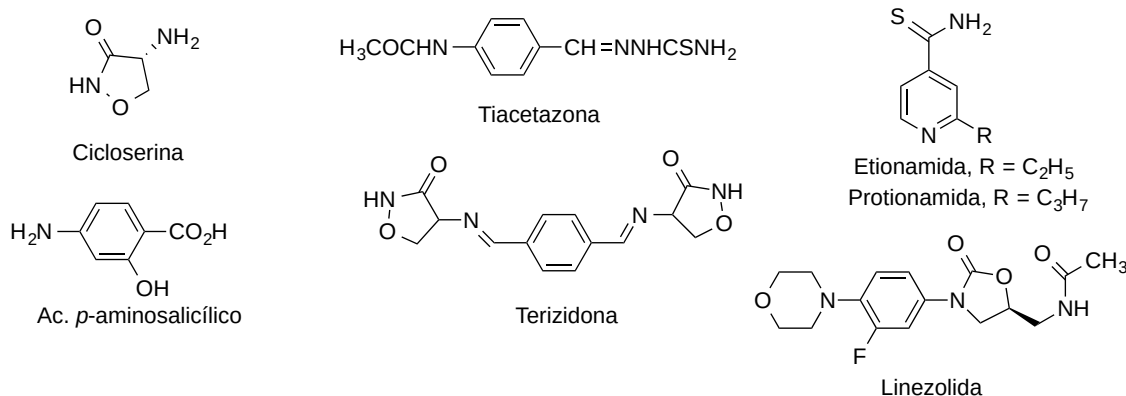
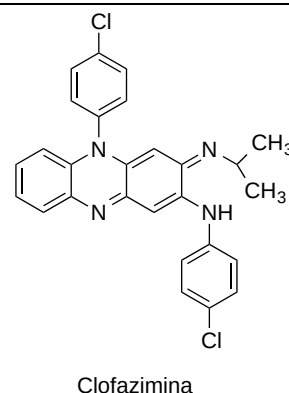


Figura 5. Antituberculosos del grupo 4.

En la 3ª línea, o grupo 5, se encuentran fármacos cuya eficacia como antituberculosos no está clara (32). Aquí se incluyen clofazimina (CFZ, Lamprene®, Figura 6), una iminofenazina utilizada en combinación con rifampicina en el tratamiento de la lepra que se investiga también para MDR-TB en combinación con otros antituberculosos: amoxicilina más ácido clavulánico (AMX/CLV), imipenemo más cilastatina (IPM/CLN), y claritromicina (CLR) (33). El tratamiento con IPM/CLN se emplea en XDR-TB, aunque su uso está limitado en principio por el precio y porque los pacientes requieren una inyección por vía intravenosa dos veces al día. En ciertos tratamientos se insertan portacaths para este propósito.



Clofazimina

Figura 6. Estructura de clofazimina.

Tuberculosis is not an illness of the past

El 20º Comité de Expertos de la OMS añadió nuevas aplicaciones y nuevos fármacos a la Lista de Medicinas Esenciales (*List of Essential Medicines*) que afecta a la tuberculosis. La rifapentina se recomienda como preventivo en infecciones latentes (*Latent TB Infections*, LTBI), mientras que para las infecciones resistentes

MDR-TB y XDR-TB (*extensively drug-resistant TB*) se recomiendan linezolid y terizidona, que ya se utilizaban *off-label* en las formas severas de resistencia, y fármacos de aprobación reciente, como bedaquilina (BDQ) y delamanida (DLM, Figura 7) (34).

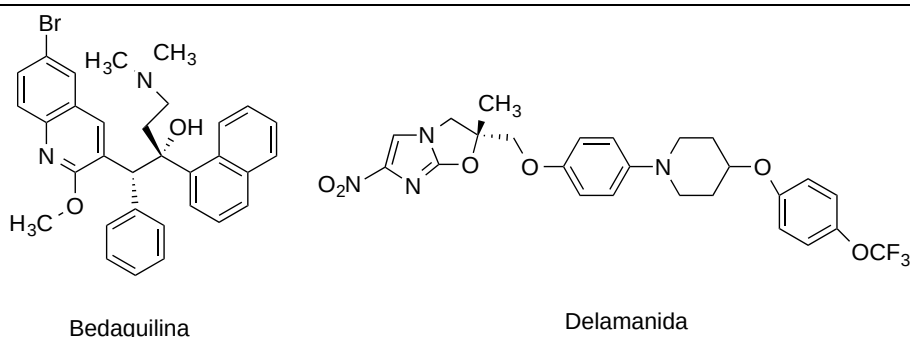


Figura 7. Estructura de bedaquilina y delamanida.

Bedaquilina (BDQ, TMC207, R207910, Sirturo®) se descubrió en el año 2005 en la empresa farmacéutica Tibotec, y se desarrolló en la empresa Janssen Pharmaceutica, siendo aprobada por la FDA en diciembre del año 2012 tras 40 años en que no se aprobaba ningún fármaco antituberculoso (35). Se seleccionó como un candidato a fármaco antituberculoso entre varios derivados de diarilquinolina por su capacidad para inhibir la sintasa de ATP micobacteriana (ver el Apartado 7) y por su actividad frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* susceptibles y resistentes (36). Su aprobación acelerada suscitó cierta controversia porque se utilizó como criterio, en vez de la disminución de la letalidad, su capacidad para convertir el cultivo de esputo de los pacientes de positivo para *Mtb* en negativo. El precio de 6 meses de tratamiento fluctúa entre 900 y 3.000 \$, por lo que este fármaco ha sido inasequible para un gran número de enfermos, aunque la organización *Stop TB Partnership* anunció que había empezado a distribuirlo a través de su programa *Global Drug Facility*. Desgraciadamente, ya han aparecido algunas cepas resistentes a bedaquilina (37), y por sus posibles efectos adversos debe prescribirse y vigilarse por expertos (38).

Delamanida (DLM, OPC-67683, Deltyba®) es un derivado de dihidro-nitroimidazooxazol desarrollado por la

empresa japonesa Otsuka que se aprobó en 2014 por la agencia japonesa del medicamento (*Japan's Pharmaceuticals Medical Devices Agency*) y por la agencia europea (EMA). Hasta el momento se comercializa en pocos países, pero se espera su registro en muchos más a lo largo de los años 2016 y 2017 (39). Delamanida se tolera generalmente bien, pero produce una prolongación del potencial de acción en el miocardio (intervalo QT del electrocardiograma). Este efecto secundario puede ser importante si el fármaco se asocia a otros antituberculosos que también lo producen, como es el caso de las fluoroquinolonas (40).

La asociación Médicos sin Fronteras está trabajando para asegurar que BDQ y DLM se incluyan en el año 2016 en los tratamientos de rutina en 25 países en que la tuberculosis es endémica.

Pretomanida (PA-824), un profármaco con mecanismo de acción complejo (41), y TBA-354 (42), que se desarrolla por la *Global Alliance for TB Drug Development* en colaboración con las universidades de Auckland e Illinois-Chicago (43), son análogos de delamanida derivados de dihidro-nitroimidazooxazina que han entrado en ensayos clínicos (Figura 8).

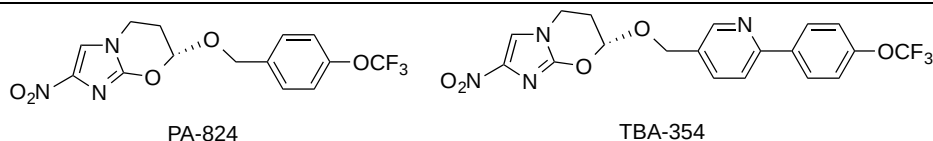


Figura 8. Estructura de PA-824 y de TBA-354.

Entre otros compuestos que han despertado el interés como antituberculosos y han entrado en ensayos clínicos (44) mencionaremos también al derivado de etilendiamina SQ109, que posee una potente actividad en MDR-TB y se desarrolla por la empresa Sequella (Figura 9). Su actividad antituberculosa se identificó por cribado de alto rendimiento de una biblioteca combinatoria de

análogos de etambutol. La FDA y la EMA le concedieron en 2007 la categoría de "fármaco huérfano" para el tratamiento de tuberculosis sensibles y resistentes, y su estudio clínico aún continúa (45). Sequella también ha identificado el compuesto SQ609 como el más activo de una serie de derivados de dipiperidina inhibidores potenciales de la pared bacteriana, aunque no se conoce

con detalle su mecanismo de acción (46). Sutezolida (PNU-100480) y AZD-5847 son derivados de linezolida. El primero es un tiomorfolinil análogo de linezolida, más eficaz en *M. tuberculosis*, que posee una eficacia

semejante a INH y RMP (47). El segundo, que desarrolla Astra Zeneca, posee acción bactericida en aislados de *M. tuberculosis* susceptible, MDR- and XDR (48).

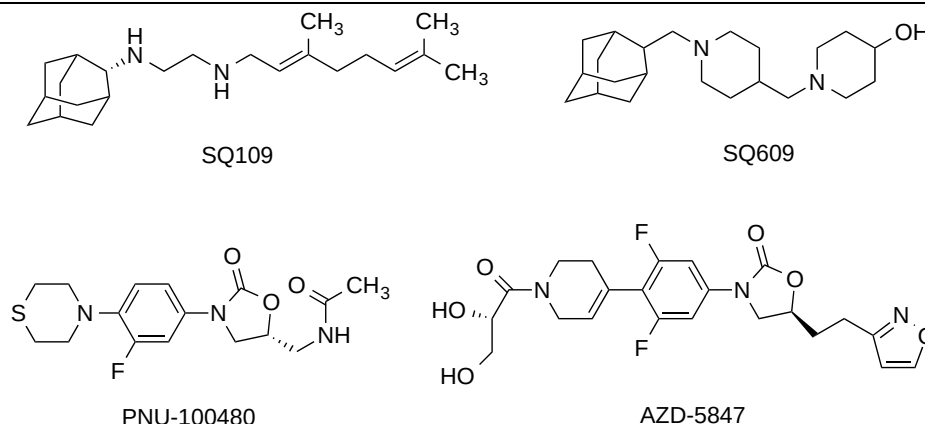


Figura 9. Estructuras de SQ109, SQ609, PNU-100480 y AZD-5847.

Muchos nuevos antituberculosos están surgiendo por cribado de alto rendimiento de grandes bibliotecas de compuestos (49). Junto a estos fármacos, dado que los mecanismos de defensa del huésped pueden conducir a una respuesta inflamatoria excesiva e ineficaz que origina la destrucción de los tejidos, se explora también el uso de algunas inmunoterapias adyuvantes.

6. ALGUNOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Un fármaco antituberculoso no sólo debe mostrar actividad antibacteriana sino inhibir el desarrollo de resistencias. La tragedia de la tuberculosis reside en que, habiendo transcurrido 60 años desde la introducción de una quimioterapia específica, el número de infecciones por organismos resistentes a la mayoría de los tratamientos antituberculosos ha ido en aumento (50). *M. tuberculosis* puede localizarse en cavidades pulmonares en las que el acceso de los antibióticos es difícil o éstos son desactivados en su mayoría por el bajo pH de aquellas (51). Según su localización, estos reservorios pueden o no ser atacados por los fármacos antituberculosos. Por ejemplo, isoniazida es crítica para los tratamientos tempranos porque es activa en bacilos que crecen en cavidades pulmonares aeróbicas. Pirazinamida es activa contra microorganismos intracelulares, sobre todo en el medio ácido de los macrófagos, siendo ideal para matar a los bacilos dentro de los focos de necrosis caseosa. Rifampicina, que inhibe la actividad de la ARN polimerasa bacteriana dependiente de ADN, es activa contra *M.*

tuberculosis de crecimiento lento e intermitente.

El mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos antituberculosos se ha descrito en los últimos 20 años y se ha empezado a entender de qué forma los microorganismos se hacen resistentes (52). Las resistencias observadas pueden deberse a mutaciones en las dianas de los fármacos o en las enzimas encargadas de su bioactivación si son profármacos (como ocurre por ejemplo en isoniazida, pirazinamida y etionamida). Para evitarlas o superarlas se utilizan combinaciones de fármacos que actúen por diversos mecanismos. A estas combinaciones se van incorporando nuevos compuestos que actúan sobre dianas ya conocidas o sobre las nuevas dianas que se van descubriendo (Figura 10).

Rifampicina tiene como diana a la polimerasa RNA, los aminoglicósidos al ribosoma bacteriano, y las fluoroquinolonas a las girasas de ADN (53). Las oxazolidinonas tienen distintos mecanismos de acción, pero se enlazan a la subunidad 23S del ribosoma bacteriano bloqueando la síntesis de proteínas. El uso continuado de linezolida, el único representante aprobado hasta el momento, produce gran toxicidad hematológica y neurológica debido a que también inhibe la síntesis mitocondrial de proteínas, haciendo necesaria una reducción de la dosis o su retirada (54). Por esa razón se necesitan nuevos fármacos de esta clase más eficaces y menos tóxicos, como es el caso de sutezolida (PNU-100480) y AZD-5847 (Figura 9).

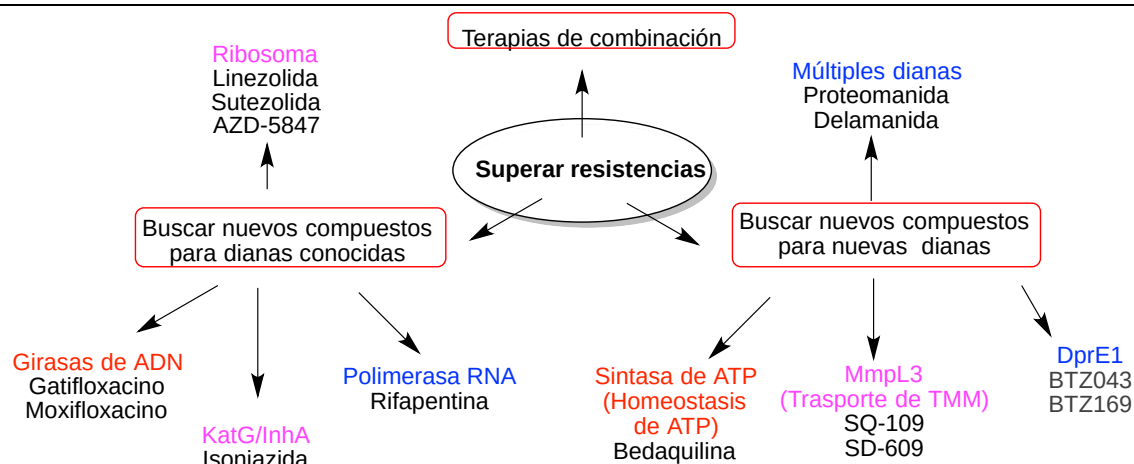


Figura 10. Ejemplos de dianas, mecanismos y fármacos antituberculosos.

Entre las enzimas implicadas en la biosíntesis de la cubierta bacteriana (55), se encuentra la enoil reductasa InhA (*Mtb enoyl-acyl-carrier-protein reductase*) (56,57) que tiene gran importancia para las micobacterias (58). Entre sus inhibidores se encuentran isoniazida, etionamida y protionamida (Figuras 2 y 5), que en realidad son profármacos. Etionamida y protionamida se bioactivan por la enzima *Mtb* EthA, una monooxigenasa de flavina (59) cuya producción está controlada por el represor de su transcripción EthR. La forma oxidada de ETH puede formar aductos con el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) inhibiendo a la enzima InhA. La isoniazida se bioactiva por la acción de la catalasa-peroxidasa *Mtb* KatG formando un hipotético radical acilo que se enlaza también a NAD^+ . El aducto covalente formado con el metabolito activo de isoniazida (**1**, Figura 11) es análogo de la forma reducida del cofactor (NADH), y compite con él para inhibir la enzima InhA. Desde la aparición de resistencias a isoniazida se han buscado otros inhibidores de InhA, que en su mayoría bloquean el lugar de unión de la enzima con el sustrato lipídico (60). La búsqueda de inhibidores que bloqueen la unión con el cofactor NADH fue infructuosa hasta el descubrimiento de un antibiótico producido por bacterias del suelo no patógenas denominado piridomicina (**2**, Figura 11). Se trata de un ciclodepsipéptido de 12 eslabones que no necesita bioactivarse y que, aunque no es un mimético de

NADH , inhibe la unión de este cofactor a la enzima InhA (61).

La descripción a nivel molecular del enlace entre la piridomicina y la enzima InhA no ha sido posible hasta fechas recientes porque no se había encontrado una técnica para obtener cristales del complejo InhA/ NADH /piridomicina útiles para su estudio por difracción de rayos X. Este problema se ha resuelto, demostrándose que piridomicina se enlaza a dos lugares: al bolsillo de unión de InhA con su cofactor NADH y al lugar de unión con su sustrato lipídico (62). Además de su eficacia, piridomicina es un prometedor antituberculoso porque no tiene que bioactivarse como isoniazida, siendo activo frente a cepas de *M. tuberculosis* que se han hecho resistentes a través de mutaciones en el gen *katG*. Sin embargo su vida media es muy corta, y su uso terapéutico requiere en primer lugar la optimización de su farmacocinética a través de la síntesis de análogos (63). Tanto isoniazida como piridomicina inhiben la producción de ácidos micólicos, compuestos grasos presentes en la pared celular de la bacteria que la protegen de las agresiones de los fármacos tradicionales y le permiten sobrevivir a tratamientos farmacológicos de corta duración e incluso la esconden del sistema inmunológico.

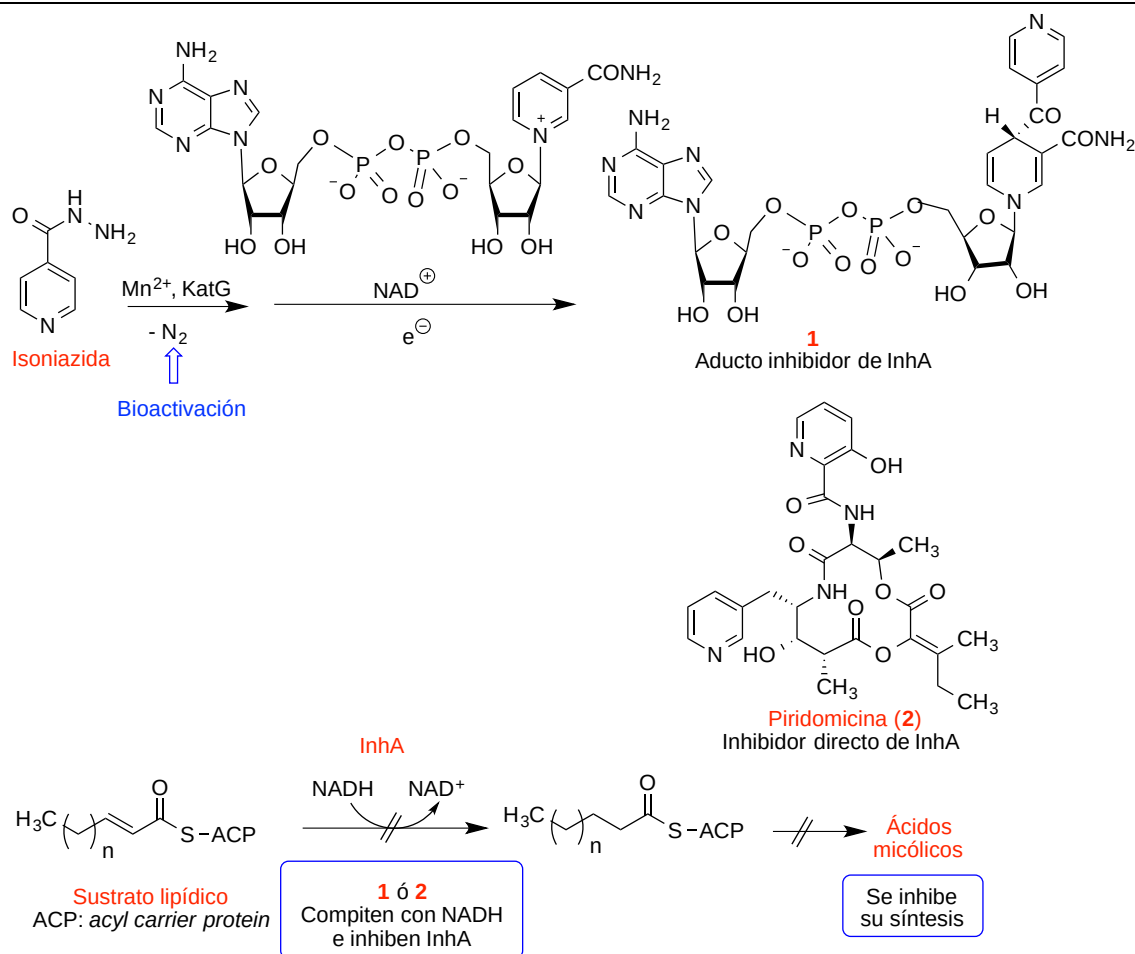


Figura 11. Inhibición de InhA por isoniazida o piridomicina.

La combinación de viejos fármacos que son eficaces pero tóxicos, como la etianamida, con inhibidores específicos de los mecanismos de resistencia desarrollados por *M. tuberculosis*, permitiría el uso de aquéllos. Estas aproximaciones terapéuticas dirigidas a potenciar la acción de antibióticos (*boosting antibiotics*) actuando sobre enzimas implicadas en el metabolismo del agente patógeno son de gran actualidad. Entre estas terapias de combinación merecen destacarse los buenos resultados de la asociación de etionamida con derivados de 1,2,4-oxadiazol como BDM31343, BDM31381 y BDM41906 (Figura 12), ya que éstos son capaces de potenciar la eficacia de dicho profármaco evitando la aparición de

resistencias a través de la inhibición de la interacción de EthR con el ADN. EthR es un represor de la transcripción de la monooxigenasa micobacteriana EthA que activa a la etionamida, por lo que permiten reducir su dosis y aumentar su índice terapéutico haciendo posible su uso como antituberculoso de primera línea (64). La toxicidad de etionamida, atribuida a los S-óxidos que origina la monooxigenasa de flavina del huésped, produce efectos secundarios como hepatitis y malestar gastrointestinal, y estos efectos dificultan la adherencia al tratamiento de los pacientes facilitando la aparición de resistencias, por lo que se utiliza sólo como tratamiento de segunda línea en TB causada por cepas MDR y XDR de *M. tuberculosis*.

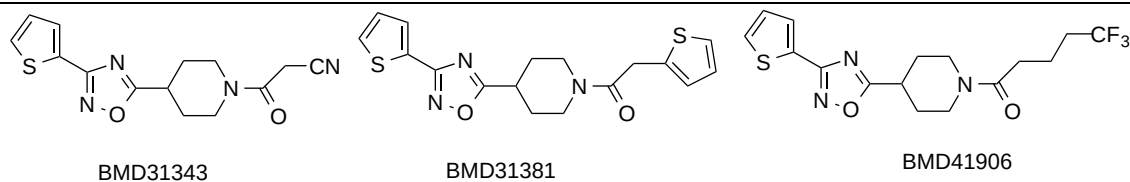


Figura 12. Estructuras de algunos inhibidores de EthR.

7. ESTUDIOS GENÓMICOS Y NUEVAS DIANAS

La implementación de procedimientos rápidos, sensibles y específicos para la identificación de *M.*

tuberculosis y sus variantes genéticas es clave para entender su virulencia y contribuir al diseño de nuevos procedimientos profilácticos o terapéuticos que permitan la erradicación de la enfermedad. El genoma de *M.*

tuberculosis alberga alrededor de 4.000 genes y destina una gran parte de su capacidad codificadora a la producción de enzimas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis. Este genoma codifica enzimas implicadas en la biosíntesis lipídica que son propias de plantas y de mamíferos, pero en su mayor parte son enzimas que catalizan la degradación de sus propios lípidos o de lípidos situados en las membranas celulares o vacuolares del huésped. Esta función resulta decisiva para su patogenicia y para la obtención de energía.

Otra diferencia importante de *Mtb* a nivel genético es que codifica proteínas ricas en glicina denominadas PE y PPE, que poseen motivos Pro-Glu y Pro-Pro-Glu en el extremo N-terminal, respectivamente. El elevado grado de polimorfismo de estas proteínas sugiere que podrían ser antígenos con capacidad para interferir la respuesta inmune inhibiendo el procesamiento antigénico necesario para su presentación. Dentro de la familia PE se encuentran las proteínas PGRS, que poseen cierto paralelismo con los antígenos del virus Epstein-Barr (EBNAS) que aprovechan el sistema ubiquitina-proteasoma para regular su persistencia en huéspedes inmunocompetentes impidiendo la presentación de algunos antígenos (65).

Desde que en 1998 se publicara el genoma de la cepa H37Rv (66), se han secuenciado otras cepas aisladas de pacientes, y se ha visto que existe una correlación inversa entre el porcentaje de genoma deleciónado de cada clon y el porcentaje de pacientes infectados con dicho clon que presentan cavitación pulmonar. Es decir, la acumulación de deleciones en *M. tuberculosis* conduce a una disminución de la virulencia de la bacteria. Además, el genoma de *M. tuberculosis* es inusualmente inerte, lo que significa que se trata de un organismo relativamente joven o que, en términos evolutivos, ha experimentado recientemente un “cuello de botella”. Un estudio dirigido al estudio de 24 genes que codifican antígenos que tienen como diana al sistema inmune humano, ha confirmado que la variación en los genes estructurales de *M. tuberculosis* es despreciable (67).

Entre la nuevas dianas de fármacos antituberculosos que se están explorando, la enzima decaprenilfosforil- β -D-ribofuranosa-2'-epimerasa (DprE1) está emergiendo como una de las más vulnerables, y entre sus inhibidores se encuentran las benzotiazinonas BTZ043 y BTZ169 (Figura 13), que producen el bloqueo de la biosíntesis de arabinanosa, componentes vitales de las paredes de las micobacterias (68).

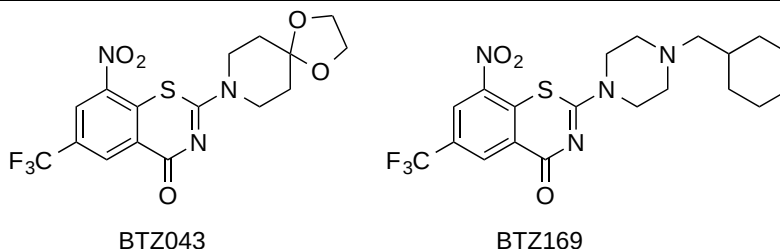


Figura 13. Ejemplos de benzotiazinonas con actividad antituberculosa.

La enzima DprE1 cataliza el primer paso de la epimerización del grupo 2'-hidroxilo de decaprenilfosforil- β -D-ribofuranosa (DPR), esencial para la biosíntesis del la

pared bacteriana, a través de un proceso dependiente de flavina adenina dinucleótido (FAD, Figura 14).

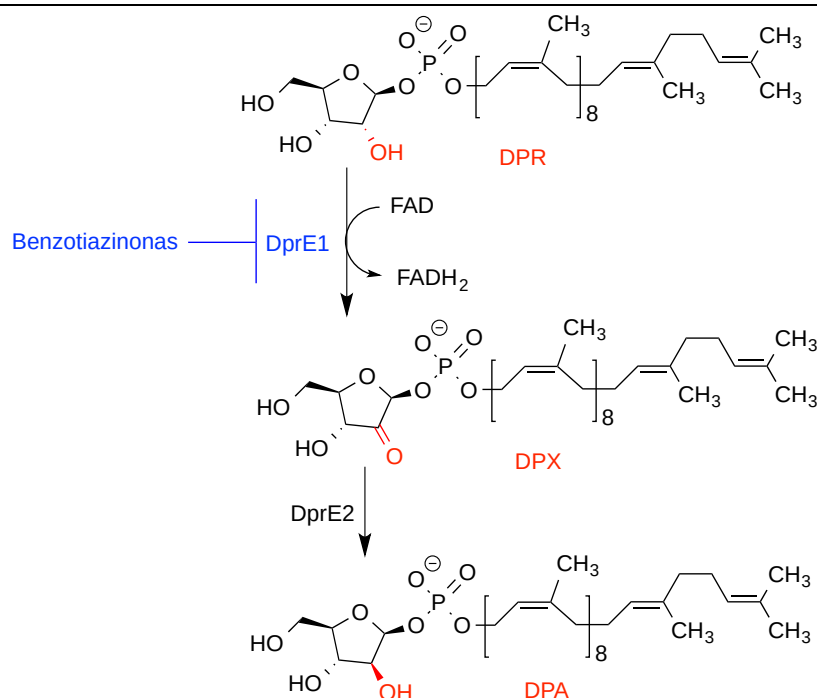


Figura 14. Inhibidores de la reacción catalizada por la enzima DprE1.

La benzotiazinona BTZ043, y supuestamente sus análogos, inhiben covalentemente esta enzima a través de la formación de un aducto con el residuo de cisteína de su centro activo Cys394 de tipo hemimercaptal (Figura 15).

El compuesto BTZ169, fruto de varios años de trabajo dirigido en gran parte a optimizar las propiedades farmacocinéticas de las benzotiazinonas, se mostró muy eficaz en combinación con bedaquilina y pirazinamida para el tratamiento de la tuberculosis utilizando un modelo de ratón, por lo que se han iniciado los ensayos clínicos con dicha combinación (69). Su desarrollo está en manos de la *spin-off Innovative Medicines for Tuberculosis (iM4TB)*, que cuenta con la ayuda económica de la

Fundación *Bill & Melinda Gates* y del Consorcio *More Medicines for Tuberculosis* dentro del Séptimo programa Marco de la UE.

Otro inhibidor de la enzima DprE1 es Ty38c, descubierto en el cribado fenotípico de una biblioteca de derivados de quinoxalina y actualmente candidato para su estudio clínico. Este compuesto es un bactericida activo intracelularmente que, según ha demostrado la difracción de rayos X, es un inhibidor no covalente y no competitivo de dicha enzima (70). Ty38c se inactiva a través de una descarboxilación catalizada por la dioxigenasa Rv3406 (Figura 16).

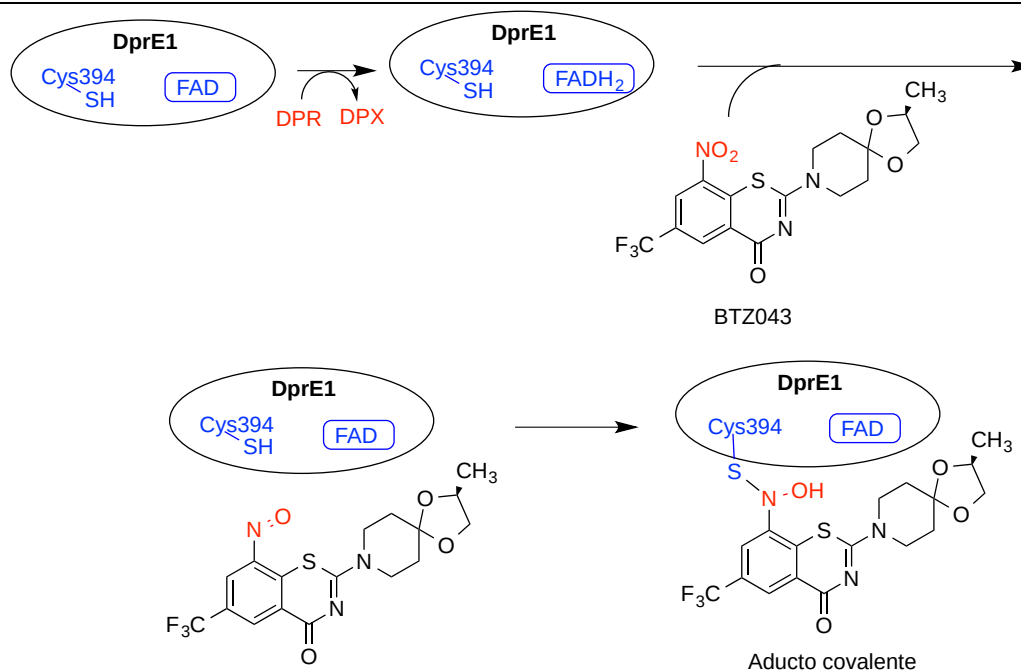


Figura 15. Mecanismo de inhibición de la enzima DprE1 por BTZ043.

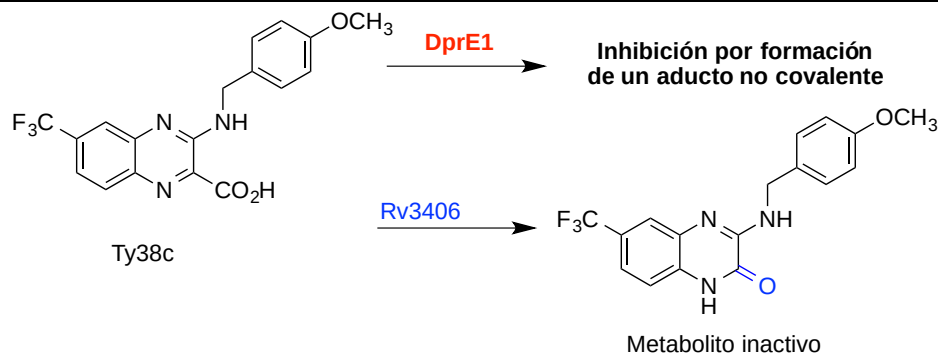


Figura 16. Actividad antimicobacteriana de Ty38c y su inactivación por Rv3406.

Otras nuevas dianas de fármacos antituberculosos son enzimas implicadas en la homeostasis de adenosina trifosfato (ATP) como reservorio de energía (71). El desarrollo de sus inhibidores se basó en el conocimiento de que las formas latentes o hipóxicas de *Mbt* tienen menores niveles de ATP. Entre estos compuestos destaca el fármaco aprobado por la FDA bedaquilina (BDQ, Figura 7), que inhibe la sintasa de ATP a pH ácido y neutro. La sintasa de ATP tiene un papel esencial en el metabolismo energético y está situada en las membranas celulares de

bacterias, plantas y animales. Su principal función es la síntesis del ATP a partir del correspondiente difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi), utilizando para ello la diferencia del potencial electroquímico de protones que se genera en la respiración o en la fotosíntesis (Figura 17). BDQ mimetiza residuos de esta bomba iónica que son esenciales en la transferencia de protones, bloqueando subunidades *c* durante la catálisis (72).

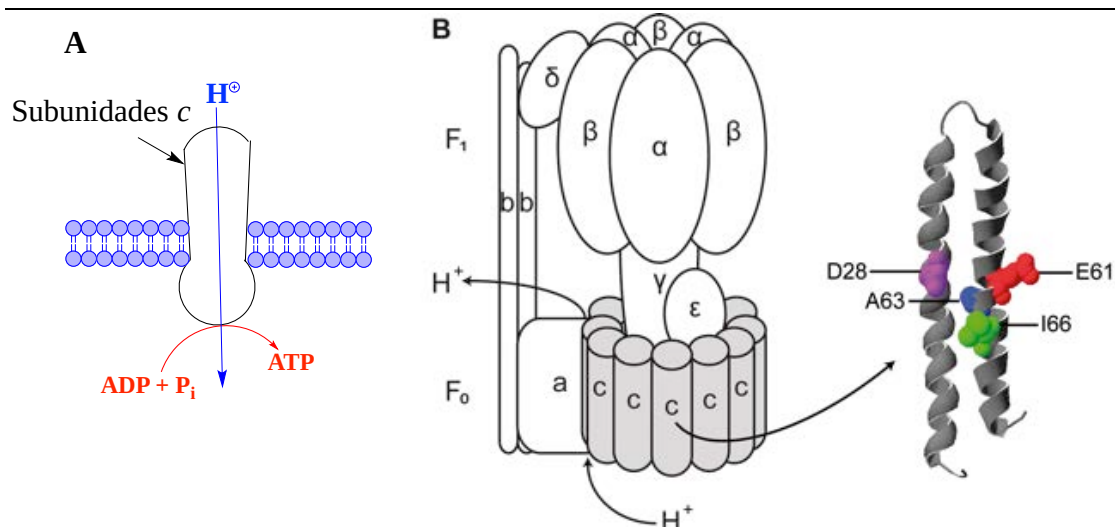


Figura 17. A: Representación esquemática de la función de la sintasa de ATP. B: Estructura polimérica de la sintasa de ATP y representación de la subunidad *c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

En esta figura, adaptada de la referencia 72a, se ha representado en rojo el residuo de ácido glutámico esencial para el transporte de protones (E61), y en distintos colores las mutaciones que afectan a su sensibilidad a bedaquilina.

Delamanida (DLM, OPC-67683, Deltyba[®]) fue activo frente a *Mycobacterium tuberculosis* in vitro e in vivo (72), determinándose después que este nitro-dihidro-imidazooxazol es un profármaco que se activa por la nitrorreductasa dependiente de deazaflavina Rv3547 e inhibe la síntesis de los ácidos metoximicólico y

cetomicólico, componentes de la pared bacteriana, posiblemente a través de un radical intermedio.

Los derivados de etilenodiamina, como SQ109 y sus análogos (Figura 9), actúan inhibiendo varias dianas. Una de ellas es la bomba de transporte MmpL3, que trasloca ácidos micólicos unidos a trehalosa (TMM) desde el citoplasma donde se sintetizan a la membrana plasmática donde se transfieren al arabinogalactano de la pared celular, o forman glicolípidos asociados a la virulencia (Figura 18) (74).

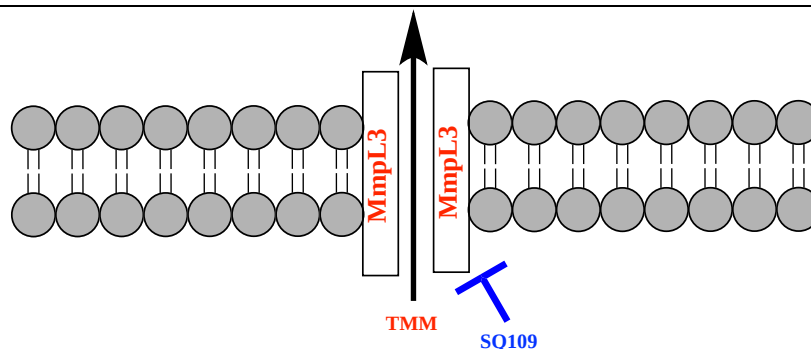


Figura 18. Inhibición de la bomba de transporte MmpL3 por SQ109.

También inhiben otras enzimas implicadas en la biosíntesis de menaquinona y de ATP, colapsando el gradiente de pH y de potencial de membrana que utilizan los transportadores de energía (75).

Otras dianas importantes son la pantotenato sintasa, que cataliza la síntesis del ácido pantoténico o vitamina B5 (esencial para la virulencia de *Mtb*) por condensación de

pantoato y β -alanina (76); la pantotenato cinasa, que fosforila al ácido pantoténico (77); y la glutamina sintetasa MtGS. Esta última está implicada en el metabolismo del nitrógeno y en la biosíntesis de la pared, y su misión es catalizar la condensación dependiente de ATP de amoníaco y L-glutamato para formar L-glutamina, ADP, fosfato y un protón (Figura 19).

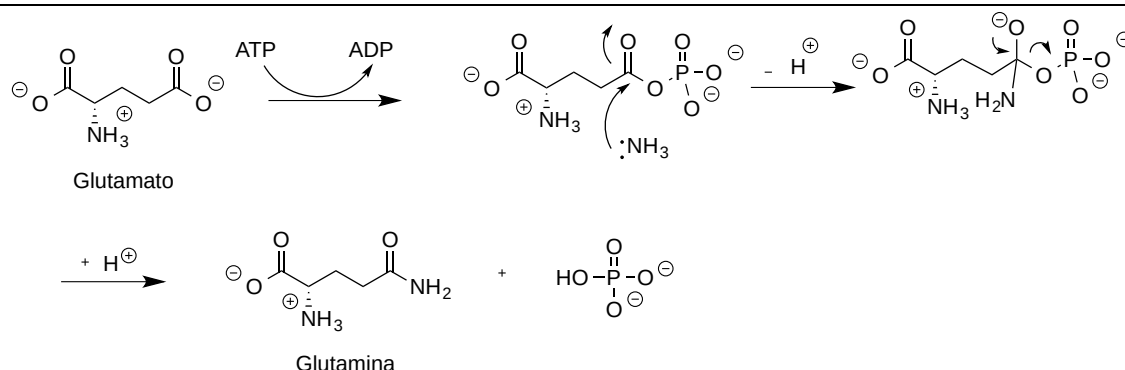
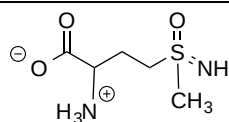


Figura 19. Mecanismo de acción de glutamina sintetasa MtGS.

Ensayos in vivo con cobayas infectados con Mtb GS demostraron que el análogo de glutamato metionina-SR-sulfoximina (MSO, Figura 20), un inhibidor de MtGs, protege a los animales de la pérdida de peso característica de la tuberculosis y del crecimiento del bacilo en distintos órganos. MSO actúa sinérgicamente con isoniazida (78).



Metionina-SR-sulfoximina

Figura 20. Estructura del inhibidor de MtGS metionina-SR-sulfoximina.

8. REFERENCIAS

1. Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002; 148: 2919-28.
2. Heifets L. Mycobacterial infections other than tuberculosis and leprosy (Infections caused by nontuberculous Mycobacteria-NTM). *Sem Resp Crit Care Med* 2004; 25: 283-96.
3. Comas I, Coscolla M, Luo T, *et al.* Out of Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genet* 2013; 45: 1176-82.
4. Brock TD. Robert Koch, a life in medicine and bacteriology. Washington: ASM Press 1999.
5. Ver por ejemplo: a) Ryan F. *Tuberculosis: The greatest story never told.* Swift Publishers Ltd 1992. b) Murphy J, Blank A. *Invincible Microbe: Tuberculosis and the Never-Ending Search for a Cure.* Harcourt Brace and Company 2015.
6. a) McMurray DN. Impact of nutritional deficiencies on resistance to experimental pulmonary tuberculosis. *Nutr Rev* 1998; 56: S147-52. b) Chocano-Bedoya P, Ronnenberg AG. Vitamin D and tuberculosis. *Nutr Rev* 2009; 67: 289-93. c) Green M. Cod liver oil and tuberculosis. *BMJ* 2011; 343: d7505.
7. Bruyn G, Garner P. *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003; DOI: 10.1002/14651858.CD001166.
8. a) Cardona PJ. Robert Koch tenía razón. Hacia una nueva interpretación de la terapia con tuberculina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 385-91. b) Cardona PJ, Amat I. Origen y desarrollo de RUTI, una nueva vacuna terapéutica contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 25-32.
9. Amberson J, McMahon B, Pinner M. A clinical trial of sanocrysin in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberculosis* 1931; 24: 401-35.
10. Feldman WH, Hinshaw HC, Mann FC. Promizole in tuberculosis. *Am Rev Tuberculosis* 1944; 50: 418-40.
11. The Therapeutic Trials Committee of the Swedish National Association against Tuberculosis. *Para-aminosalicylic acid treatment in pulmonary tuberculosis.* *Am Rev Tuberc* 1950; 61: 597-612.
12. Fox W, Sutherland I. A five-year assessment of patients in a controlled trial of streptomycin, *para-aminosalicylic acid*, and streptomycin plus *para-aminosalicylic acid*, in pulmonary tuberculosis. *Q J Med* 1956; 25: 221-43.
13. McDermott W. Antimicrobial therapy of pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ* 1960; 23: 427-61.
14. Shepherd RG, Wilkinson RG. Antituberculous agents II. *N,N'*-diisopropylethylenediamine and analogs. *J Med Pharm Chem* 1962; 91: 823-35.
15. Andriole VT. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S113-S119.
16. Tsukamura M, Nakamura E, Yoshii S, Amano H. Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL8280) on pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 352-6.
17. Singh J, Cameron Ch, Noorbaloochi S, *et al.* Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2015; 386: 258-65.
18. Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, *et al.* Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-95.

19. Arias, M. Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa. *Arch Bronconeumol* 2011; 47: 521-30.
20. a) Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection-an update. *Ann Intern Med* 2008; 149: 177-84. b) Dorman SE. New Diagnostic Tests for Tuberculosis: Bench, Bedside, and Beyond. *Clin Infect Dis* 2010; 50: S173-S177.
21. a) Kaufmann SHD, Lange Ch, Rao M, *et al.* Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies. A state of the art review. *Lancet Resp Med* 2014; 2: 301-20. b) Asensio JG, Aguiló N, Martín-Montañés C. Nuevas vacunas contra la tuberculosis. *Investigación y Ciencia* 2014; 38-46.
22. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, *et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 2013; doi: 10.1093/cid/cit790.
23. Guilleron M, Quesniaux VFJ, Puzo G. Acylation State of the Phosphatidylinositol Hexamannosides from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Its Implication in Toll-like Receptor Response. *J Biol Chem* 2003; 278: 29880-89.
24. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go?. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002607.
25. a) McShane H, Pathan AA, Sander CR, *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG primed and naturally acquired anti-microbial immunity in humans. *Nat Med* 2004; 10: 1240-44. b) Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, *et al.* Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 2013; 381: 1021-28.
26. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, *et al.* Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 2013; 31: 4867-73.
27. Vilaplana C, Montané E, Pinto S, *et al.* Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine* 2010; 28: 1106-16.
28. Sponsor: Manresana de Micobacteriologia SL. Safety and Immunogenicity of Nyaditum Resae® Probiotic to Protect From Tuberculosis. *ClinicalTrials.gov* 2014; Identifier: NCT02076139.
29. a) Green KD, Garneau-Tsodikova S. Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go? *Front Microbiol* 2013; 4: 208. b) Chung-Delgado K, Guillén-Bravo S, Revilla-Montag A, Bernabe-Ortiz A. Mortality among MDR-TB cases: comparison with drug-susceptible tuberculosis and associated factors. *PLoS One* 2015; 10: e0119332.
30. Dalton T, Cegielski P, Akksilp S, Asencios L, *et al.* Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: A prospective cohort study. *Lancet* 2012; 380: 1406-17.
31. Hwang TJ, Wares DF, Jafarov A, *et al.* Safety of cycloserine and terizidone for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Internat J Tuberculosis and Lung Disease* 2013; 17: 1257-66.
32. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 388-404.
33. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368: 745-55.
34. Ver la web: <http://www.who.int/medicines/areas/quality assurance>.
35. a) Mahajan R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int J Appl Basic Med Res* 2013; 3: 1-2. b) Avorn J. Approval of a tuberculosis drug based on a paradoxical surrogate measure. *JAMA* 2013; 309: 1349-50.
36. Guillemont J1, Meyer C, Poncelet A, Bourdrez X, Andries K. Diarylquinolines, synthesis pathways and quantitative structure-activity relationship studies leading to the discovery of TMC207. *Future Med Chem* 2011; 3: 1345-60.
37. Segala E, Sougakof W, Nevejans-Chauffour A, Jarlier V, Petrella S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure. *Antimicrobial Agents Chemother* 2012; 56: 2326-34.
38. Lessem EM, Bernardo J, C, DH. Informed use of bedaquiline for tuberculosis. *Lancet* 2015; 385: 1724.
39. a) Xavier AS, Lakshmanan M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *J Pharmacol Pharmacother* 2014; 5: 222-4. b) Lewis JM, Sloan DJ. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Ther Clin Risk Manag* 2015; 11: 779-91.
40. Szumowski JD, Lynch JB. Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 677-82.
41. a) Manjunatha U, Boshoff IMH, Barry CE. The mechanism of action of PA-824. *Commun Integr Biol* 2009; 2: 215-18. b) Diacon AH, Dawson R, Hanekom M, *et al.* Early Bactericidal Activity and Pharmacokinetics of PA-824 in Smear-Positive Tuberculosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3402-07.
42. Upton AM, Cho S, Yang TJ, *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of the Nitroimidazole TBA-354 against *M. tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 136-44.
43. Ver: <http://www.newtbdrugs.org/project.php?id=48#sthash.HvBZAUWr.dpuf>.

44. Ma Z, Lienhardt C, McIlleron H, Nunn AJ, Wang X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*. 2010; 375: 2100-9.
45. Sacksteder KA, Protopopova M, Barry CE, Andries K, Nacy CA. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol* 2012; 7: 823-37.
46. Bogatcheva E, Hanrahan C, Nikonenko B, *et al*. Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 5353-57.
47. Alffenaar JWC, van der Laan T, Simons S, *et al*. Susceptibility of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to a potentially less toxic derivate of linezolid, PNU-100480. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1287-89.
48. Phase 2a EBA Trial of AZD5847. *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT01516203.
49. Ananthan S, Faaleolea ER, Goldman RC, *et al*. High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis* 2009; 89: 334-53.
50. Dye C. Tuberculosis 2000-2010: control, but not elimination. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: S146-S152.
51. a) Elliott AM, Berning SE, Iseman MD, Peloquin CA. Failure of drug penetration and acquisition of drug resistance in chronic tuberculous empyema. *Tuber Lung Dis* 1995; 76: 463-467. b) Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 908-14.
52. Gillespie SH. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 267-74.
53. a) Dinakaran M, Senthilkumar P, Yogeewari P, *et al*. Novel ofloxacin derivatives: synthesis, antimycobacterial and toxicological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18, 1229-36. b) Chopra S, Matsuyama K, Tran T, *et al*. Evaluation of gyrase B as a drug target in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012, 67: 415-21. c) Shirude PS, Madhavapeddi P, Tucker JA, *et al*. Aminopyrazinamides: novel and specific GyrB inhibitors that kill replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* 2013; 8: 519-23. d) Karkare S, Chung TT, Collin F, *et al*. The naphthoquinone diospyrin is an inhibitor of DNA gyrase with a novel mechanism of action. *J Biol Chem* 2013; 288: 5149-56.
54. McKee EE, Ferguson M, Bentley AT, Marks TA. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2042-49.
55. Ver por ejemplo: a) Makarov V, Manina G, Mikusova K, *et al*. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science* 2009; 324: 801-4. b) Pasca MR, Degiacomi G, Ribeiro AL, *et al*. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1616-18.
56. a) Boechat N, Ferreira VF, Ferreira SB, De Lourdes GFM, *et al*. Novel 1,2,3-triazole derivatives for use against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) strain. *J Med Chem* 2011; 54, 5988-99. b) Lamichhane G. Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs, *Trends Mol Med* 2011, 17: 25-33.
57. Ver por ejemplo: a) Sullivan TJ, Truglio JJ, Boyne ME, *et al*. High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* 2006; 1: 43-53. b) Vilcheze C, Baughn AD, Tufariello J, *et al*. Novel inhibitors of InhA efficiently kill *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and anaerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3889-98. c) Kinjo T, Koseki Y, Kobayashi M, *et al*. Identification of compounds with potential antibacterial activity against *Mycobacterium* through structure-based drug screening. *J Chem Inf Model* 2013; 53: 1200-12.
58. Parikh SL, Xiao G, Tonge PJ. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* 2000; 39: 7645-50.
59. Wang F, Langley R, Gulten G, *et al*. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* 2007; 204: 73-8.
60. a) He X, Alian A, Stroud R, Ortiz de Montellano PR. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* 2006; 49: 6308-23. b) Ballell L, Castro J, Fernandez R, *et al*. (Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-amine and (pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiazole-2-amine compounds. *World Intellectual Property Organization* 2010; WO2010118852 A1.
61. a) Hartkoorn RC, Sala C, Neres J, *et al*. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 1032-42. b) Avendaño C. Hacia un nuevo fármaco antituberculoso. *Anales RANF* 2012; 78: 288-97. c) Perryman AL, Yu W, Wang X, *et al*. A Virtual Screen Discovers Novel, Fragment-Sized Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *J Chem Inf Model* 2015; 55: 645-59.
62. Hartkoorn RC, Pojer F, Read JA, Gingell H, *et al*. Pyridomycin bridges the NADH- and substrate-binding pockets of the enoyl reductase InhA. *Nature Chem Biol* 2014; 10: 96-99.
63. Ver: Altmann K-H, Horlacher O, Hartkoorn R, S (inventors). Pyridomycin based compounds exhibiting an antitubercular activity. *Patente WO2014040709 A1*, 20 Marzo de 2014.
64. a) Wolff KA, Nguyen L. Strategies for potentiation of ethionamide and folate antagonists against

- Mycobacterium tuberculosis*. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10: 971-81.
65. Masucci MG. Epstein-Barr virus oncogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene* 2004; 23: 2107-15.
 66. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.
 67. Arnold C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 120-8.
 68. Riccardi G, Pasca MR, Chiarelli LR, *et al.* The DprE1 enzyme, one of the most vulnerable targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 8841-8.
 69. a) Neres J, Pojer F, Molteni E, *et al.* Structural basis for benzothiazinone-mediated killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* 2012; 4:150ra121. b) Makarov V, Lechartier B, Zhang M, *et al.* Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 372-83.
 70. Neres J, Hartkoorn RC, Chiarelli LR, *et al.* 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through noncovalent inhibition of DprE1. *ACS Chem Biol* 2015; 10, 705-14.
 71. Diacon AH, Pym A, Grobusch M, *et al.* The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2009; 360: 2397-05.
 72. a) Haagsma AC, Podasca I, Koul A, *et al.* Probing the Interaction of the Diarylquinoline TMC207 with Its Target Mycobacterial ATP Synthase. *PLoS ONE* 2011; 6: e23575. b) Lu P, Villellas C, Koul A, *et al.* The ATP synthase inhibitor bedaquiline interferes with small-molecule efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *J Antibiot* 2014; 67: 835-37.
 73. Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, *et al.* OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med* 2006; 3: e466.
 74. Rayasam GV. MmpL3 a potential new target for development of novel anti-tuberculosis drugs. *Expert Opin Ther Targets* 2014; 18: 247-56.
 75. Li K, Shurig-Bricio LA, Feng X, *et al.* Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases. *J Med Chem* 2014; 57, 3126-39.
 76. Yang Y, Gao P, Liu Y, *et al.* A discovery of novel *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate synthetase inhibitors based on the molecular mechanism of actinomycin D inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 3943-46.
 77. Venkatraman J, Bhat J, Solapure SM, *et al.* (2012). Screening, identification, and characterization of mechanistically diverse inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme, pantothenate kinase (CoaA). *J Biomol Screen* 2012; 17: 293-302.
 78. a) Harth G, Clemens DL, Horwitz MA. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*-Extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sc USA* 1994; 91: 9342-46. b) Harth G, Horwitz MA. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo. *Infect Immun* 2003; 71: 456-64. c) Mowbray SL, Kathiravan MK, Pandey AA, Odell LR. Inhibition of Glutamine Synthetase: A Potential Drug Target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* 2014; 19: 13161-76.



Sesión científica conmemorativa de los Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina y en Química



Juan Ramón Lacadena Calero
Coordinador de la sesión
Sesión celebrada el 26 de noviembre de 2015
e-mail: jrlgbucm@bio.ucm.es

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

“El Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina”

“El Premio Nobel 2015 en Química. Reparación del daño genético: retorno a los primeros tiempos de la genética en la era genómica”

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

“Premio Nobel 2015 de Fisiología o Medicina. Jaque al dolor y muerte por parasitismos: homenaje a dos iniciativas formidables de salud”

Excmo. Sr. Antonio R. Martínez Fernández

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

“Premio Nobel de Química 2015. Genes reparadores del ADN”

Excmo. Sr. Manuel R. Benito de las Heras

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

El Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina

Juan-Ramón Lacadena Calero

El 5 de octubre pasado, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska decidió conceder el Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina en una mitad conjuntamente a los doctores William C. Campbell y Satoshi Omura “por sus descubrimientos relativos a una nueva terapia contra las infecciones causadas por nematodos parásitos” y en la otra mitad a la Dra. Youyou Tu “por sus descubrimientos relativos a una nueva terapia contra la Malaria”.

Al día siguiente de la concesión del premio, recibí un correo del Profesor Antonio Martínez que me permito transcribir parcialmente. Decía así:

“Ha sido una grata sorpresa leer hoy que el Nobel de Fisiología o Medicina le ha sido concedida a los doctores W.C. Campbell y S. Omura artífices de los dos antiparasitarios, las avermectinas –derivados del antibiótico de *Streptomyces avermectilis*– Ivermectina, Doramectina, etc. activas frente a nematodos y artrópodos y a la doctora. china Youyou Tu en reconocimiento del aislamiento del último y más eficaz antipalúdico

procedente del extracto de *Artemisia annua*, la artemisina y derivados. Puedes suponer mi sorpresa y al tiempo mi alegría. Aunque han esperado mucho para semejante reconocimiento, el número de vidas y especialmente el número de años de vida sin salud liberados por estos fármacos, merecían este reconocimiento.”

Continuaba su escrito el profesor Antonio Martínez diciendo:

“Conozco personalmente a Williams C. Campbell, me ayudó en 1964 a realizar mi tesis doctoral (me envió separatas, técnicas y muestras gratuitas de tiabendazol...que había aislado e identificado como antihelmíntico... Coincidió más tarde en varios de los congresos organizados por la ICT (International Conference on Trichinellosis)... Vino a Alicante en 1988, con ocasión de la 8th ICT, etc....” En definitiva, está más que justificada la presencia como ponente del profesor Martínez para glosar las investigaciones galardonadas con el Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina.

Premio Nobel 2015 de Fisiología o Medicina. Jaque al dolor y muerte por parasitismos: homenaje a dos iniciativas formidables de salud

Antonio R. Martínez Fernández

Corresponding Author: amf@ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 4 (2015), pp. 359-379

INTRODUCCIÓN

Pocas veces se ha concedido el premio Nobel a parasitólogos y no siempre con gran acierto. El primero en 1902 a Ronald Ross “por sus trabajos sobre la malaria, por como el agente entra en el organismo”... – no le acompañó en el galardón Giovanni Battista Grassi, el verdadero descubridor, el que experimentalmente demostró que mosquitos anofeles de los pantanos, transmitían el paludismo. Sí lo recibió en 1907 Charles Louis Alphonse Laveran que había descubierto previamente que era un protozoo el agente causante de la Malaria.

El tercer premio Nobel a un parasitólogo se concedió en 1926. Lo recibió el danés Johannes Andres Grib Fibiger por su hipótesis inflamatoria de la etiopatología del cáncer gástrico provocado por un nematodo espirúrido.

Otro Nobel con motivo parasitológico indirectos es el concedidos en 1927 a Julius Wagner-Jantegg por el tratamiento de la parálisis general e idiocia ocasionada por sífilis mediante la infección experimental con *Plasmodium vivax*. El parasitismo inducido y la hipertermia de los primeros abscesos palúdicos producían el efecto terapéutico. La infección parasitaria se trataba posteriormente con quinina. No había recidivas puesto que la infección se hacía a partir de sangre de un donante naturalmente infectado, es decir, con sólo esquizontes y merozoitos hemáticos.

Justamente el año siguiente, 1928 se concede a Charles Jules Henry Nicolle, oficialmente por su descubrimiento de la transmisión del tifus exantemático por el piojo corporal (*Pediculus corporis*), pero también por su fructífera vida como microbiólogo práctico y parasitólogo, creador del medio de cultivo de *Leishmania* y descubridor del protozoo *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux 1909, en el roedor de laboratorio *Ctenodactylus gondi*; en los pobres gundís que posiblemente se infectaron con los gatos del animalario del Instituto Pasteur de Tunes, dirigido por Charles Nicoll, ya que libres en el desierto muy raramente se infectan con toxoplasma de modo natural.

En 1951, la concesión recayó en el gran investigador en parasitología tropical Max Theiler “por sus iniciativas en el combate de la fiebre amarilla”. Con la perspectiva del tiempo, en este premio vemos también el homenaje al trabajo extraordinario de su padre Sir Arnold Thailer eminente microbiólogo y parasitólogo veterinario, emigrado desde Suiza a Sudáfrica, en honor del cual se

denominó el género *Theileria*, un apicomplejo parásito hemático de rumiantes, cuyo ciclo y transmisión estudió; gran limitante junto con *Trypanosoma brucei* de las producciones pecuarias en el Este africano.

Antes de la ocasión que ahora celebramos, sólo otros galardonados como el de Paul Herman Müller 1942 por el descubrimiento del insecticida DDT, rozan el campo general de la parasitología (1). Es de destacar que a pesar de las resistencias, el DDT, prohibido como pesticida por su impacto ambiental, sigue siendo válido como insecticida de contacto aplicado en el interior de las viviendas. Su eficacia es tan notoria que incluso selecciona las poblaciones de anofeles transmisores de la malaria que no descansan tras la toma de sangre en el interior de las viviendas donde duermen las personas; vuelan al exterior liberándose así de la muerte que supone posar sus almohadillas plantares sobre las paredes y techos de las viviendas pintadas con DDT u otros preparados insecticidas como el de la empresa española Inesflay (2).

Es curioso resaltar, que también esta vez que el Nobel recae en parasitólogos sea también el paludismo y su terapia uno de los logros reconocidos.

Es curioso también que en 1997 uno de los galardonados en esta ocasión, el Dr. Campbell (3) sugiriera a los parasitólogos más estudios sobre la relación entre parasitismos y cáncer, al tiempo que salía en defensa del único Nobel 1926 a un helmintólogo. Hacia 1907, el Dr. Fibiger había observado la relación entre la infección de la rata por un nematodo que denominó *Gongylonema neoplasticum* Fibiger et Ditlevsen, 1914 (Nematoda, Spirurida) y un cáncer gástrico, lo que reprodujo experimentalmente, hazaña sin duda para su tiempo. El trabajo premiado fue duramente criticado posteriormente ya que en condiciones de alimentación correcta, con suficiente aporte de vitamina A, el nematodo no causaba más que transformaciones celulares precancerosas. Con la elegancia que le caracteriza indica Campbell que merece la pena volver sobre el tema pues hay nuevas evidencias relacionadas con parasitismos y cáncer como el sarcoma canino mortal ocasionado por *Spirocerca lupi*, un nematodo de la misma clase que el estudiado por Fibiger. Pedía con ello limpiar el honor mancillado de Fibiger; lejos estaba en su proverbial modestia de reclamar para sí el galardón que ahora le otorgan. Aunque no sea de momento el trastorno más evidente causado por los parasitismos, sí es cierto que otros helmintos como *Opisthorchis viverrini* y otros opistórkidos parásitos hepáticos, intervienen activamente en la alta prevalencia

de colangiocarcinomas en las áreas endémicas del sudeste asiático (4). Además, mientras redactaba esta revisión/homenaje al nobel de los parasitólogos, aparece en New England Journal of Medicine un trabajo inquietante, que cambia conceptos, al asociar parasitismo con cáncer: describe la diseminación metastática de un cáncer de células no humanas; de un cáncer del cestodo *Hymenolepis nana* en un paciente inmunocomprometido con SIDA (5).

En esta ocasión el Nobel de Fisiología o Medicina premia a dos iniciativas terapéuticas antiparasitarias, la del antihelmíntico ivermectina (6), un ecdísocida (7), y la del antimalárico artemisinina.

PRIMERA PARTE DEL NOBEL 2015. IVERMECTINA

La primera mitad a “W.C. CAMPBELL y S. Ōmura for discovering avermectin, *“the derivatives of which have radically lowered the incidence of river blindness and lymphatic filariasis, as well as showing efficacy against an expanding number of other parasitic diseases”*”.

Ivermectina 1. Descubrimiento

El descubrimiento de este grupo de antibióticos antihelmínticos se realizó en 1975 en el Instituto Merck para Investigaciones Terapéuticas MSDRL (Merck, Sharp & Dohm Research Laboratory), Rahway, New Jersey, USA, en el Departamento de “Descubrimiento de Nuevos Fármacos”, dentro del programa liderado por el Dr. W.C. Campbell de cribado de nuevos compuestos para uso veterinario. Gracias a la eficacia del modelo experimental de infección controlada de ratones con el nematodo *Heligmosomoides polygyrus* (sin. *Nematospiroides dubius*) se detectó la actividad del caldo de cultivo de uno de los *Streptomyces* aislados y enviados a Merck por el Instituto Kitasato dirigido por el Prof. Sitoshi Ōmura, dentro de un programa de colaboración financiado por Merck. Entre 50 aislamientos crecidos, el caldo donde se había cultivado la cepa OS-3153, aunque muy tóxico en el primer ensayo para los ratones hospedadores, poseía una actividad nematodocida radical. Repetido el ensayo tanto con el medio de cultivo como con el micelio lavado no se observó toxicidad alguna conservándose la actividad. Había nacido la droga que denominaron C-076, una mezcla de antibióticos con actividad antihelmíntica. La bacteria productora de esta droga había sido aislada de una tierra recogida en el campo de Golf Kawana, a la orilla del mar, cerca de la ciudad turística de Ito en la prefectura Shizoka, situada frente al Pacífico en el sureste de Honsū.

El programa de búsqueda de nuevos principios de origen natural procedentes de fermentaciones de microorganismos, bacterias y hongos principalmente, contaba con los modelos parasitológicos de terapéutica experimental. Este laboratorio creado entre otros por el eminente parasitólogo Ashton C. Cuckler (1910-2000) (8) y seguido por W.C. Campbell tenía en su haber el desarrollo de coccidiostáticos tan útiles como

sulfaquinoxalina, nicarbacina, amprolium, etopavato, etc. y muy particularmente los antihelmínticos Thiabendazol y Cambendazol los primeros bencimidazoles, así como el fasciolicida rafoxanida. Pero además, de la fermentación de microorganismos procedían los antibióticos ionóforos de tanto éxito frente a coccidios que por este tiempo se desarrollaban. Un laboratorio con el bagaje histórico, los conocimientos y las herramientas adecuadas para detectar moléculas antiparasitarias activas.

A partir de la gran actividad manifestada por la cepa C-076 frente a nematodos se formó en el centro de investigación de Merck un extenso equipo de químicos, biólogos, parasitólogos, microbiólogos y veterinarios que aislaron e identificaron, guiados por el ensayo *in vivo* del laboratorio de Campbell, los componentes activos frente a nematodos parásitos, excretados por la cepa. Casualmente, se observó también la actividad de estos antibióticos frente a artrópodos: primero frente a ácaros, los que espontáneamente infectaban a uno de los conejos utilizados en los ensayos farmacológicos, sobre insectos, más tarde, ya que al ensayar la actividad nematodocida en caballos naturalmente infectados con pequeños estróngilos, el tratamiento, ocasionó primero la expulsión masiva de las larvas parásitas de un múscido (gasterófilus, rednos) que infectaban también a los caballos utilizados como modelo. La droga del cultivo de la cepa C-076 era activa frente a nematodos y artrópodos. Por esta causa, en el primer trabajo en que se denuncia el descubrimiento del nuevo antiparasitario (9) denominaron a estos antibióticos como avermectinas (**a**, sin -anti, **verm** de la raíz latina *vermis-is*, vermes, más **ect** de *ecto*, externo, diminutivo de ectoparásito y el sufijo **in**, sustancia; es decir, avermectin, sustancia anti endo y ectoparásitos, endectocida, neologismo que se acuña para significar la actividad frente a endo y ectoparásitos). Se describe en este trabajo pionero, mediante ensayos controlados de actividad realizados en ovejas, vacas, perros, gallinas y ratones experimentalmente infectados, que las avermectinas extendían su actividad al menos a ocho familias de nematodos: *Filariidae*, *Oxyuridae*, *Trichinellidae*, *Trichuridae*, *Heterakidae*, *Metastrongylidae*, *Trichostrongylidae* y *Strongylidae*, tanto frente a adultos como frente a estados larvarios, intra y extra-intestinales hipobióticas o activas, de especies tanto susceptibles como resistentes a bencimidazoles. Había nacido una nueva y formidable herramienta antiparasitaria. A esta primera publicación del equipo liderado por WC Campbell sobre actividad antiparasitaria se sucederán otras varias (10), (11), (12) y especialmente el libro editado en 1989 (13), donde a través de 21 capítulos firmados por investigadores de MSDLR se desgranar los diversos aspectos del descubrimiento, producción, actividad, farmacología y el uso en medicina veterinaria y humana, así como pesticida de estos antibióticos. El relato del descubrimiento del fármaco lo describe entre otros el propio autor William C. Campbell (14) y (15). El laboratorio del Dr. Campbell que había desarrollado los primeros grandes antihelmínticos después de las piperazinas, contaba con los modelos

parasitarios de terapéutica experimental adecuados, tenía la capacidad previa de búsqueda de un antiparasitario y lo encontró.

En la publicación conjunta de investigadores de Merck y Kitasato (16) se denominó la especie productora de estos antibióticos antiparasitarios como *Streptomyces avermitilis* Burg et al 1979. El epíteto *avermitilis* no gustó demasiado a alguno de los firmantes de la primera publicación por lo que posteriormente, en un trabajo (17), por otra parte meritorio, en el que por técnicas de taxonomía molecular sitúan a la nueva especie dentro del contexto de los estreptomicetes conocidos, proponen re-denominar a la especie como *S. avermectinius* Takahashi et al 2002 ya que *avermectinius* significa perteneciente a, procedente de avermectina. El nombre es efectivamente más correcto, pero si se respeta la Ley de la Prioridad de los códigos de nomenclatura, se convierte en un sinónimo tardío. El nombre válido es el primero, *S. avermitilis*.

Ivermectina 2. ¿Dudas interesadas?

La concesión del Nobel 2015 vino a zanjar la disputa larvada entre el potente grupo japonés y el Dr. W.C. Campbell indefenso jubilado hace 25 años de Merck & Co. A raíz de la concesión en 2014 a Satoshi Ōmura del premio Gairdner (*Gairdner Global Health Award*) “por el descubrimiento del microorganismo *Streptomyces avermitilis* y su actividad biológica extraordinaria que, en colaboración con Merck, condujo a la identificación de avermectinas y el desarrollo de ivermectina, un tratamiento altamente eficaz para muchas enfermedades parasitarias, así como al consorcio global dirigido a eliminar la ceguera de los ríos”, parecía que todo el mérito de la existencia de este “fármaco maravilloso” se debía al laboratorio japonés (18), (19), (20). Al paso salieron los parasitólogos Molyneux y Taylor 2015 (21) reivindicando la real autoría del descubrimiento por William C. Campbell y lo hicieron a tiempo. El Nobel 2015 de Fisiología o Medicina vino a terminar satisfactoriamente esta cuestión.

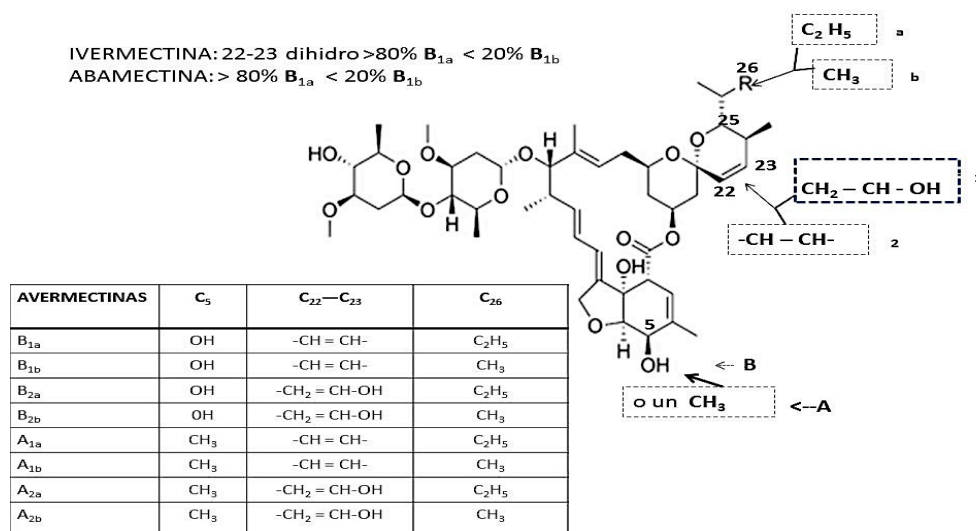
El trabajo del aislamiento de los principios activos, pautado en el tiempo por el ritmo biológico de la infección experimental con *H. polygyrus*, ya que cada molécula aislada se pasaba por el modelo *in vivo*, condujo a la identificación de un conjunto de lactonas macrocíclicas

con un residuo disacárido, las avermectinas naturales A₁, A₂, B₁ y B₂. Los compuestos A tienen un **CH₃** en posición 5 y los B un **H** con un doble enlace entre los carbonos 22-23. Los cuatro compuestos principales se dividen a su vez en ocho componentes, véase Figura 1, adaptada a partir de la original de Fisher y Merozik 1989 Capítulo 1:2¹³. Los compuestos mayoritarios A_{1a}, A_{2a} y B_{1a} y B_{2a} cuentan con un butil secundario en el **C25**. Los restantes, minoritarios, están en proporciones entre 1 y 20 %.

La selección genética tras un programa de mutación y modificaciones en el medio de cultivo, optimizó la producción de la molécula **nativa B_{1a}** con mayor actividad frente a nematodos y artrópodos (ácaros e insectos). A partir de esta molécula un proceso químico que tiene por objetivo modificar el doble enlace entre los carbonos 22-23, produce una mezcla de dos dihidroanálogos con mejores características toxicológicas que la molécula nativa. Esta mezcla semisintética de dos moléculas homólogas es Ivermectina, (22,23- dihidroavermectina: con > 80% de **B_{1a}** y < 20 % de **B_{1b}**). También la molécula nativa cuenta con cualidades suficientes para su comercialización directa como endectocida bajo la denominación significativa de Abamectina (¿del arameo *abba*, padre?).

Así nació una nueva familia de fármacos antiparasitarios, con diferente mecanismo de acción que los hasta entonces conocidos, con amplísimo margen de seguridad, aplicables por vía oral, parenteral y cutánea que desde 1981 en que salieron al mercado como medicamentos de uso veterinario, se convirtieron en el específico más empleado en este campo, con ventas anuales de alrededor de 1000 millones de dólares. Salvo los trematodos y cestodos, que son los otros dos grupos que cuentan con abundantes parásitos de los vertebrados, la práctica totalidad de los macroparásitos, son susceptibles de eliminación o control con estos antibióticos. Las milbemicinas, otras lactonas macrocíclicas de estructura similar, descubierta independientemente, sin el disacárido en el carbono 13 (22), fueron identificadas primero como acaricidas y como nematodocidas más tarde una vez visto el éxito en el mercado veterinario de la Ivermectina (IVM).

IVERMECTINA: 22-23 dihidro >80% B_{1a} < 20% B_{1b}
 ABAMECTINA: > 80% B_{1a} < 20% B_{1b}



Ivermectina 3. Modo de acción

Lentamente comenzó a entenderse cuál era la causa de su acción endectocida, estos es, frente a nematodos y artrópodos. Se estudió primero la capacidad de fijación de IVM y análogos a preparaciones de membrana del nematodo *Coenorhabditis elegans*, observándose que había una relación directa entre la actividad antihelmíntica de los análogos y su capacidad de fijación; cuanto mayor afinidad por las membranas de *C.elegans* mayor poder antihelmíntico. Por otra parte, la afinidad de la IVM por las preparaciones de membrana cerebral de mamífero era más de 100 veces menor, sin que los neurotransmisores, incluyendo ácido γ-amino butírico (GABA) alteraran esta capacidad. Posteriormente, en preparaciones *ex vivo* de nervios de artrópodos y de *C.elegans* se observó la gran afinidad de IVM por la zona de unión del GABA, sin alterar su lugar de unión, comportándose como agonista parcial del mismo. Por otra parte, en preparaciones de músculo de pata de cucaracha (*Periplaneta*) se comprobó que la IVM, hasta en muy bajas concentraciones, paralizaba el músculo al tiempo que estimulaba la adquisición de Cloro (Cl) y que esta actividad era antagonizada por picrotoxina. Se interpretó que la IVM paralizaba el músculo abriendo los canales iónicos de Cl. En sentido contrario, como la IVM no causaba efectos estimuladores sobre antagonistas del GABA, se concluye que la IVM no se une en el mismo lugar que el GABA, sino directamente en otro punto del canal iónico de cloro. En preparaciones de sistema nervioso de artrópodos, se comprobó que la IVM ocasiona también la apertura de canales presinápticos de Cl (en ausencia de activación por GABA), induciendo despolarizan del terminal nervioso y la neurotransmisión. (23). Más tarde, se observó que la molécula básica B_{1a} (abamectina) actúa estimulando la liberación presináptica de GABA, potenciando la unión a sus receptores post-sinápticos; a los de glutamato, entre otros. Por el mismo mecanismo de ampliación del GABA, en los artrópodos, a través de un aumento de la permeabilidad de la membrana al Ca, impide la

transmisión de señales en las sinapsis neuromusculares, ocasionando parálisis y muerte.

Es un agonista del GABA. Actúa (farmacodinamia) uniéndose a los canales de cloro activados por GABA y a los canales aniónicos activados por glutamato, de la familia de canales iónicos con "lazo de cisteínas" activados por ligando, presentes en los ecdisozos (nematodos y artrópodos), situados en las sinapsis interneuronales y neuromusculares periféricas, suprimiendo la transmisión del impulso nervioso (24). El aumento de la permeabilidad de iones Cl y la hiperpolarización subsiguiente de la membrana en la neurona motora, interrumpe la transmisión nerviosa ocasionando parálisis neuromuscular.

Como es un agonista del GABA la IVM puede también interactuar con otros canales de Cl activados por ligando como el GABA. Afortunadamente los mamíferos sólo poseen estos canales en el sistema nervioso central y en la médula espinal y la IVM además de tener baja afinidad por estos canales de mamífero no cruza la barrera hematoencefálica. Esta afortunada circunstancia (farmacocinética) se debe a varios factores: naturaleza muy lipofílica de la IVM, ausencia de poros en el endotelio vascular y la integridad bioquímica a través de la bomba de eflujo de la glicoproteína P que impide la entrada de moléculas extrañas al SNC. Si pasara la barrera hematoencefálica ocasionaría depresión, coma y muerte. Esto es lo que ocurre en determinadas razas de perros (collies, por ejemplo y afines) y ratones FC-1 con deficiencia funcional o ausencia del gen *MDR1* que se expresa en la glicoproteína P¹⁶.

El desarrollo práctico de las avermectinas ha sido rapidísimo. Descubiertas en 1975, dos años más tarde, ya estaban autorizadas para uso veterinario y en 1982 comenzaron a usarse en humanos. En 1987, en la profilaxis de oncocercosis. Se extendió posteriormente al control de las filariosis linfáticas, de la sarna costrosa resistente, de las pediculosis multi-resistentes y siguen abriéndose nuevos campos de aplicación práctica, como por ejemplo, el tratamiento tópico de la rosácea (25) en crema al 1%.

Ivermectina 4. Otras aplicaciones

Se exploran además otras capacidades ya conocidas o potenciales. Por ejemplo, su contribución al control del paludismo a través de las campañas de control de la oncocercosis – véase más adelante - ya que hasta dos semanas después del tratamiento estándar con IVM los mosquitos transmisores de la malaria (*Anopheles gambiae* en el área de la observación) mueren tras picar a la persona tratada (26), (27). Lo propio ha sido observado entre los flebótomos transmisores de *Leishmania*, lo que podía tener importancia para aquellas áreas geográficas que por padecer Oncocercosis y estar sometidas al tratamiento masivo periódico de la población con IVM padecen también alguna de las leishmaniosis, Sudan del Sur, Etiopía, etc. Los Phlebotomos que pican durante un tiempo de alrededor de una semana tras el tratamiento con IVM no mueren de inmediato sino que se acorta significativamente su vida; el efecto parasiticida directo es poco significativo y sólo sobre los promastigotes (28). Esta actividad indirecta del tratamiento con IVM adquiere mayor significado en el control de la enfermedad del sueño ya que las vacas tratadas con IVM, prescrita para controlar sus parasitismos gastrointestinales, disminuye significativamente la supervivencia de las glossinas (moscas tsetse) (29), lo que desafortunadamente aun no es significativo hasta que no se seleccionen más razas bovinas tripanorresistentes. Esta actividad antivectorial es más difícil que se extienda a la lucha contra *Fasciola hepática* o *Schistosoma spp.*, pues aunque la IVM tiene capacidad molusquicida, afortunadamente por otra parte, tiene escasa solubilidad en el agua, fijándose al sedimento. La baja solubilidad en el agua y la fuerte fijación al suelo limitan sus efectos letales sobre los artrópodos (larvas de coleópteros y múscidos) que contribuyen a disponer y eliminar las heces de los animales en el campo, vía por la que se elimina íntegra la mayoría del fármaco en los animales tratados. Afortunadamente no actúa sobre hongos ni es bactericida, salvo para rickettsiales – bacterias parásitos endocelulares que no están en el suelo- por lo que la transformación ecológica de las heces, especialmente las boñigas de vaca, aunque más lentamente, dependiendo de la temperatura ambiente, también se produce (30), deshaciéndose con ello la alarma de “un mundo aboñigado” con el que se llamó en principio la atención (31).

Se sugiere que la IVM puede, sola o asociada a otros antimaláricos, jugar un importante papel futuro en el control de la malaria ya que inhibe, a concentraciones submicromolares, el transporte desde el citoplasma al núcleo de proteínas esenciales para la supervivencia del parásito dentro del eritrocito. Este transporte está mediado por las carioferinas α/β (importinas α/β) dímeros que cargan con proteínas etiquetadas con las SRPs (partículas-señal de reconocimiento) y las pasan a través de los poros nucleares al interior del núcleo, reciclándose al citoplasma a continuación. La IVM bloquea este proceso, bien impidiendo la dimerización de las carioferinas o bien la entrada de la SRPs a través de los poros nucleares (32). En

otro plano, este mismo mecanismo, en este caso en la célula hospedadora, puede afectar al ciclo endocelular de virus tales como VHI-1 y virus del Dengue y otros flavivirus. En el virus VIH-1 a través de las VHI-integrasa y en los cuatro serotipos de Dengue a través de la polimerasa NS5 (proteína no estructural 5) (33).

Otro capítulo importante de las futuras aplicaciones de IVM es su capacidad antitumoral primeramente observada en leucemias (34), atribuida a la hiperpolarización de la membrana celular de la célula tumoral ocasionada por la entrada de iones cloro con aumento de la actividad de especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo parece que sinergiza la acción de fármacos antitumorales activos por incremento de ROS. Este trabajo pionero está siendo seguido por numerosas aportaciones de otros grupos estudiando la actividad antitumoral experimental en cáncer de cuello de útero y leucemia crónica.

Algunas de las aplicaciones promisorias para controlar, paliar o tratar enfermedades neurológicas: epilepsia, Parkinson, drogodependencias, incontinencia, depresión, etc., etc. como las que describe la patente de Costa y Diazgranados en 1993 (35), no han sido llevadas, en lo que conozco, a la práctica clínica. Asumen que IVM en el sistema nervioso humano actúa más como antagonista que agonista del GABA; si así fuese, el campo de aplicaciones del fármaco y sus aliados se expandiría. En relación con esta hipótesis, sí es cierto que en la profilaxis de los SIDA avanzados se recomendó en ocasiones la inclusión de IVM (0,2 mg/kg semanal) como profilaxis de escabiosis, estrongiloidosis y contribuir al control del estrés, ansiedad y depresión. En sentido contrario, en la exquisita prevención de la intoxicación por ingreso masivo de IVM al SNC hay sólida incompatibilidad medicamentosa con los inhibidores de proteasas de VIH, así como con las estatinas, varios de los bloqueadores de los canales de calcio, glucocorticoides, lidocaína y benzodiacepinas. La razón básica de estas incompatibilidades estriba en que los inhibidores de la oxidasa hepática de xenobióticos CYP3A4 inhiben frecuentemente también la glicoproteína de transporte (glicoproteína-P) que en los endotelios de la barrera hemato-encefálica impide el paso a la IVM.

Ivermectina 6. Desarrollo farmacéutico y mercado

Su campo, fructífero por otra parte, se sigue ciñendo al control de los parasitismos por nematodos y artrópodos, con excepciones, tanto de los animales domésticos, su mayor mercado, como del hombre.

Lo que ha sido extraordinario, ante las perspectivas de mercado, es el escalado farmacéutico industrial de estos antibióticos antiparasitarios. La fusión endémica entre empresas farmacéuticas deja el mercado de estas lactonas macrocíclicas, en los momentos actuales, en tres únicas compañías: Merck & Co., Zoetis (recientemente separada de Pfizer) y Novartis. A la primera empresa pertenecen los medicamentos en sus diversas presentaciones por vía de administración y especie, cuyos principios activos son *ivermectina* para uso veterinario y humano, *abamectina* para uso veterinario o como pesticida y *emamectina*

benzoato como pesticida. Zoetis, por su parte, comercializa moléculas derivadas de avermectina tales como *doramectina* para uso veterinario como endectocida y *selamectina*, molécula puente entre avermectinas y milbemicinas, también para uso veterinario. Por otra parte, lo hace también con la milbemicina B molécula semisintética de la nemadectina antibiótico producido por *Streptomyces cyano-griseus* (originariamente por American Cyanamid, 1980) como *moxidectina* para uso veterinario. Una tercera empresa, en este caso europea, Novartis- fruto de la fusión de Ciba Gegy y Sandoz -, produce, procedente de la fermentación de otra especie de *Streptomyces hygroscopicus* var *areolacrimosus*, *milbemicina-oxima* también de uso veterinario.

Ivermicina 7. El uso en la especie humana

7.1 Oncocercosis (ceguera de los ríos)

En otro lugar y ocasión revisaremos el amplísimo campo del uso de ivermectina, derivados y competidores en las especies animales, especialmente en el control de las tricostrongilosis, strongilosis, metastrongilidosis, etc., así como sarnas, hipodermosis y otras miasis, etc., etc.

El uso humano surgió como idea de W.C. Campbell al ver los resultados de los ensayos de evaluación de actividad de IVM sobre équidos en la granja de investigación de Merck en Sprindale, AR (36). Además de la extraordinaria actividad frente a las larvas emigrantes y los adultos de los grandes estróngilos, pequeños estróngilos y oxiúrido, así como frente a gasterófilos (*Gastrophilus intestinalis* y *G.nasalis*), comprobaron que dosis tan pequeñas como 0,1 mg/kg disminuía hasta la eliminación la presencia de las microfilarias de *O. cervicalis*, una filaria específica de los équidos, con la particularidad añadida de que no se producían reacciones inflamatorias violentas como podía ocurrir con otros microfilaricidas como la dietil-carbamazina. Otras filarias: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *B.timori*, *Onchocerca volvulus*, entre las más importantes, parasitan al hombre causando enfermedades debilitantes y deformantes: elefantiasis y ceguera de los ríos. Campbell redactó un informe sugiriendo el empleo de la nueva droga para combatir y controlar las filariosis humanas. La dirección de la empresa aceptó la idea y dispuso la financiación adecuada.

El médico Mohammed A. Aziz director de investigaciones clínicas de Merck fue encargado de dirigir la evaluación clínica humana del uso de IVM frente a *Onchocerca volvulus*, el agente causal de la oncocercosis o ceguera de los ríos, una enfermedad extendida por toda África intertropical, Yemen y Centro y Suramérica. No había en el tiempo estadísticas fiables de la prevalencia del proceso pero sí el conocimiento de la escandalosa proporción de adultos ciegos por esta enfermedad en áreas infectadas, pobres y empobrecidas también por la expulsión que la enfermedad causaba de las tierras de regadío más fértiles y productivas. Los recursos terapéuticos contaban con grandes dificultades, pues, aunque la dietilcarbamazina (Hetrazan, una piperazina) es

un microfilaricida eficazísimo, su aplicación ocasiona fuertes respuestas inflamatorias - reacción de Mazzoti -, que agravan las lesiones oculares. El mejor recurso válido por entonces era la lucha con insecticidas frente al vector, las especies antropófilas de *Simulium* conocidas como moscas negras. Así se hizo usando DDT hasta su prohibición y fosforados más tarde, con los que se logró cortar la transmisión en Kenia y disminuirla en áreas de África occidental subsahariana, pero que resultó harto difícil e inoperante en otras áreas. Una idea de la prevalencia, en los datos de OMS de 2010 (37) para el año 1995 era de unos 42 millones de personas infectadas, con 385.000 ciegos, 944.000 con visión limitada, 29,7 millones de personas con prurito grave.

Tras las primeras aplicaciones positivas de ensayo clínico Fase I realizados por el Dr. Aziz, él mismo dirigió y estimuló una serie de ensayos repetidos de Fase II y III (38) en colaboración con la OMS gracia al convenio OMS/Merck de 1982, realizados en años sucesivos en: Ghana, Guatemala, Costa de Marfil, Liberia, Malí, Senegal y Togo. Estos ensayos demostraron que una dosis anual única de 150 a 200 µg/kg de IVM lleva a cero, pasado el primer mes, la densidad de microfilarias y mantiene niveles bajos de microfilaremia dérmica durante los 12 meses post-tratamiento. La IVM no es macrofilaricida, las hembras adultas del nematodo continúan vivas aunque con capacidad reproductiva disminuida.

Muchos otros grupos y en diferentes áreas endémicas de la enfermedad confirmaron la eficacia y seguridad del uso de la IVM frente a las microfilarias de *Oncocerca* y sus consecuencias. Estaba claro que el ciclo biológico de este parásito se podía cortar definitivamente a través de tratamientos anuales con una sola dosis de IVM. Consecuentemente, para la aplicación segura registró en Francia, en 1987 IVM para uso humano bajo el nombre de Mectizan®. El registro en USA, como Stromectol® lo autoriza la FDA nueve años más tarde para el tratamiento de la strongiloidosis y oncocercosis.

7.2. Oncocercosis. El altruismo imprevisto de Merck & Co.

Estaba claro que IVM era la herramienta adecuada para combatir y erradicar la ceguera de los ríos pero alguien tenía que proveer los fondos para producirla y distribuirla a precio mínimo, o gratis y responsabilizarse de las consecuencias de los efectos adversos que pudiera ocasionar. Merck solicitó financiación a diversos organismos: OMS, USAID (Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional), el Departamento de Estado y el Congreso de los Estados Unidos, con el apoyo de los más influyentes senadores del momento, pero nadie respondió positivamente. Por todo esto, en un gesto de extraordinaria repercusión mundial, el CEO (Presidente y ejecutivo en jefe) de Merck & Co. Dr. Pindaros Roy Vagelos decretó en este mismo año 1987 que Merck “regalará a quien la necesitare, tanta ivermectina como sea necesaria, durante el tiempo que sea necesario” (39), (40).

Poner en práctica este gesto, es decir llevar hasta el

paciente del lugar más remoto de África y América los pequeños comprimidos de Mectizan, para aplicarlos a la dosis adecuada del modo más sencillo, evaluando el número de comprimidos a ingerir de acuerdo con la altura, medida con una colección de varas estándar, sin intervención médica, por un vecino de la comunidad, instruido al efecto como colaborador de la lucha contra la enfermedad, supuso concertar muchas organizaciones: OMS, Ministerios de Salud estatales, Banco Mundial, Grandes fundaciones, ONGs... y especialmente las organizaciones locales y los voluntarios colaboradores. Relatémoslo, merece la pena.

Merck y la OMS afrontaron el reto que significó fabricar, llevar y distribuir Mectizan a millones de personas en los 35 países del área de dispersión de la enfermedad. A este fin, en 1988, Merck creó un Comité de Expertos para Mectizan, un grupo independiente de expertos en medicina tropical y salud pública. Este grupo analizaba y juzgaba las solicitudes y programas concretos, con duración mínima de tres años, ampliado más tarde a cinco, de las ONGs, Ministerios Nacionales de Salud y agencias locales encargados del suministro gratuito de la medicina. Hasta la fecha ha dado el visto bueno a proyectos terapéuticos sobre los focos endémicos de 35 países de África central, Yemen e Iberoamérica.

En 1974 la OMS había creado el programa de control de la oncocercosis (OCP) financiado por las agencias de Naciones Unidas UNDP (para el desarrollo) y FAO (para la agricultura y alimentos), así como el Banco Mundial, destinado a los 11 países del África occidental: Benín, Burkina Faso, Costa de Marfil, Ghana, Guinea Bissau, Guinea, Mali, Niger, Senegal, Sierra Leona y Togo. La lucha inicial fue exclusivamente frente al vector, con insecticidas. Desde 1987 en que se implantó la aplicación de IVM, se hizo combinando ambas medidas o sólo con IVM. Su éxito lo demuestra el hecho que para el 2002 se había cortado el ciclo de infección vector/hombre (*Simulium damnosum* s.lat./ *Oncochercha volvulus*/hombre), salvo en Sierra Leona, por la guerra endémica que padecía.

En 1988, Merck estableció un convenio de colaboración con la organización político-benéfica Centro Carter en Atlanta, transfiriendo a ésta una parte del soporte administrativo y el seguimiento, evaluación, progreso y dificultades de los programas en ejecución para las américas y la elaboración de nuevos programas.

En 1990 se creó la estructura regulatoria MDP (Merck MECTIZAN® Donation Program) encargada de aprobar la entrega de ivermectina a las ONGs, órdenes religiosas y demás servicios sanitarios oficiales o benéficos. El Secretariado del programa de donación MEC / MECTIZAN aprueba los proyectos de aquellas ONGs que demuestren su establecimiento en el terreno, sus medios adecuados de trabajo y se comprometan en proyectos de al menos cinco años de duración. Aprobado el proyecto Merck a través de su Office of Contributions, se encarga de los trámites logísticos desde la fábrica en Europa al lugar de aplicación.

En los 19 países del Centro y Este africano, con oncocercosis en principio menos patógena, la llamada forma selvática, y aquellos con baja endemicidad, excluidos de la OCP, sólo las ONGs mediante convenios particulares con Merck fueron realizando programas locales de control. Las ONGs, y órdenes religiosas fundamentalmente de la Iglesia Católica, continuaron con esta labor humanitaria a pesar de las guerras y rivalidades en los países afectados. Su labor fue y es encomiable; allanaron el camino, enseñaron como diagnosticar y prevenir, y poco a poco, en el transcurrir del tiempo lograron que su actividad fuera asumida por las organizaciones locales permanentes. Y continúan en labores de educación sanitaria, difusión de información, amén de supervisión y crítica de la gestión incompleta o incorrecta.

En 1994 el Programa de Desarrollo de Naciones Unidas (UNDP) el Banco Mundial y el TDR (programa especial de investigación y formación en Enfermedades Tropicales de la OMS) modificaron la ejecución final el Programa de Control de Oncocercosis, instaurando el sistema CDTI (tratamiento con IVM realizado directamente por la comunidad, por la aldea y en la aldea). Los propios afectados organizan el tratamiento dirigido por un monitor local adiestrado al efecto. No se lo impone un médico, un extranjero de lengua extraña, es un igual que conoce y realiza el modo de aplicación, el tiempo y la dosis adecuada y a las personas. Su éxito ha sido rotundo ya que así se ha llegado a los lugares más apartados, con peores accesos, sin alterar la cotidianidad de su vida y costumbres. Al éxito del programa contribuyó también el boca a boca favorable al tratamiento bianual o trimestral – según el grado de prevalencia – ya que las pastillas hacen que la gente se sienta mejor, expulse sus parásitos, -- los áscaris, ancilostomas y tricúridos se observan perfectamente en las heces --, y los varones ven incrementada su libido, lo que no se sabe si es real o leyenda. Por otra parte, especialmente en la población escolar, la desparasitación que supone el tratamiento preventivo activo también frente a infecciones con *Trichuris trichiura* y/o ancilostómidos, revierte el retraso en el crecimiento físico e intelectual producido por el parasitismo; aumenta la asistencia al colegio y el rendimiento escolar. Además de estas mejoras indirectas, la población aprecia las directamente atribuibles a la falta de microfilarias emigrando en la dermis: la reducción drástica del prurito, de las erupciones cutáneas, inicio de oscurecimiento de las manchas blanquecinas de las áreas de piel reiteradamente rascadas hasta ocasionar rozaduras y cicatrices despigmentadas, del aumento de la elasticidad de la piel y el subsiguiente mejor aspecto, como de rejuvenecimiento y lo que es más importante, la mejora en la agudeza visual. Además, un sencillo diagnóstico de inmunocromatografía que detecta la presencia de antígeno circulante sirve de control, sin biopsia dérmica, de la eficacia. Al tiempo, permite la elaboración del mapa real, tanto del avance del control como de circunstancias adversas tales como: la incompatibilidad con las

infecciones altas por *Loa loa*, el establecimiento de resistencias o el retroceso en el control.

A partir de 1995 se extendió a los 19 países (41) fuera del OCP el sistema CDTI y se englobaron todas las actividades de control bajo un único programa, APOC (1995-2015) (programa africano para el control de la oncocercosis, hasta 2015). De este modo el programa se extendió a alrededor de 120 millones de personas, suministrando los beneficios relatados y alrededor de 40.000 cegueras menos por año. El objetivo principal del programa es establecer el tratamiento con IVM de toda la población, al menos una vez al año. El programa además de geolocalizar los focos endémicos dispersos de 20 países con prevalencia menor, ha realizado las campañas de tratamiento en los 16 países con mayor incidencia – alrededor de 71,5 millones de personas bajo riesgo-.

El éxito del sistema CDTI ha servido para ampliarlo a otras actuaciones sanitarias integrales como la filariasis linfática, esquistosomosis, y la prevención del paludismo con mosquiteros impregnados de insecticidas o la aplicación preventiva, estacional de un complemento de hierro, vitamina A y un antipalúdico.

La IVM actúa lentamente y en colaboración con el sistema inmune con lo que la liberación del simbionte bacteriano *Wolbachia* a la sangre después del tratamiento es también paulatino y mejor tolerado. Al parecer es *Wolbachia* la causante de la hiper-respuesta inflamatoria que agrava las lesiones oculares y dérmicas. Esta bacteria es sensible a las tetraciclinas y la doxiciclina, excelente antipalúdico también, puede prevenir las respuestas indeseadas postratamiento (42).

A través de los años de tratamiento masivo de la población, nuevas zonas donde se interrumpió el ciclo quedan libre de infección, se recuperan tierras fértiles que habían sido abandonadas, se cambia la estructura social de las comunidades. Hacia el 2002 en todos los países bajo el programa APOC, salvo Guineas Bissau y Sierra Leona con guerra casi continua y Ghana, se logró interrumpir la transmisión, con lo que más de 40 millones de personas quedaron libres de infección, 600.000 ciegos menos, 18 millones de niños nacieron en una tierra donde ya no van a ser infectados de *Onchocerca* y ciegos o discapacitados de mayores. Además sus padres tienen más medios de vida al recuperar para el cultivo miles de hectáreas fértiles abandonadas.

Hoy más de 1000 millones de gentes han sido tratadas desde el comienzo del programa, produciéndose todavía la aplicación a 80 millones de personas en África, Hispanoamérica y Yemen, gracias a lo cual la ceguera por oncocercosis ha desaparecido y grandes regiones de América y África se han declarado ya libres de la enfermedad (43), (44).

El programa APOC se diseñó para concluir en el 2015, lo que ya no es posible por lo que se ha ampliado hasta el 2025, es decir se necesita continuar con el esfuerzo. Se erradicó en dos de los grandes países con desierto y sabana, Mali y Senegal, en el resto la lucha continúa y su éxito dependerá de la continuidad del programa, de la

financiación que lo permita y del avance en los métodos de diagnóstico, de la educación sanitaria y del progreso económico

7.4 Ivermectin y filariasis linfáticas

Desde 2008, en colaboración con GSK (Glaxo Smith-Kline Beechan) el objetivo se amplió al control simultáneo de la Filariasis linfática, tratándose unos 80 millones de personas/año y acumulándose ya por encima de 304 millones de tratados con ivermectina y albendazol, a través también del MDP. El ejemplo de la asociación para el tratamiento gratuito de las enfermedades tropicales desatendidas, incita a otras compañías, formándose una red cooperativa que está reduciendo el azote de los parasitismos en los países más pobres de la tierra.

7.5. Ivermectina en Iberoamérica

En Iberoamérica, la erradicación de la oncocercosis se abordó de modo diferente, dirigido de modo eficaz por la más antigua de las organizaciones internacionales de salud, la Organización Panamericana de salud (OPS, PAHO en idioma inglés) fundada en 1902, que es el representante regional de la OMS. Los programas de control y eliminación de la oncocercosis en América (OEPA), planificaron la interrupción del ciclo de transmisión de *Oncocerca* para el 2015, objetivo logrado en todo el territorio, salvo en el área Sur de Venezuela/Norte de Brasil. La estrategia seguida, como en África, fue el tratamiento masivo con IVM al menos dos veces por año a todas las comunidades con oncocercosis endémica, cubriendo aproximadamente el 85 % de la población señalada. El agente ejecutivo de los proyectos fue el Centro Carter y el donante Merck a través del MDP (*Mectizan donation program*) más una serie de entidades colaboradoras: USAID (*US Agency for International Development*), *Lions Club*, los CDCs (*USA Centers for Disease Control and Prevention*), Fundación Bill & Melinda Gates, etc.)

Colombia y Ecuador fueron los primeros en cortar la transmisión en 2007 y 2009 respectivamente, certificándose la eliminación en el 2013 y 2014. México y Guatemala lograron cortar la transmisión en 2011. En este 2015 se acaba de certificar la eliminación total en México (45). La transmisión se detuvo primero en 11 focos de los 13 detectados. Persiste sólo en dos focos, en Venezuela y Brasil, con los semi-nómadas Yanomani, habitantes en la selva a uno y otro lado de la frontera, lo que es una dificultad añadida. Hay un acuerdo diplomático suscrito entre ambos países para forzar el tratamiento en masa de los Yanomani (46). Es realmente difícil: las poblaciones son muy pequeñas, cambian de lugar cuando agotan los recursos renovables, el área es muy extensa y sólo asequible mediante canoas. Además, el tratamiento no cuenta con la buena aceptación que tiene en África. De nuevo, el esfuerzo de Merck merece un cálido aplauso: desde su inicio en 1989 se ha suministrado a la población bajo riesgo americana más de 13 millones de tratamientos.

Ivermectina 8. Limitaciones

La IVM ha sido un gran regalo en todos los sentidos y sólo la oscurecen un par de circunstancias. Por una parte el temor a que surjan resistencias, por otra, los raros pero graves casos aislados de efectos secundarios graves y mortales cuando se tratan personas simultáneamente infectadas con *Loa loa*. La resistencia ha comenzado a observarse y se manifiesta por la selección genética de respuesta consistente en el aumento de frecuencia del gen de la tubulina que confiere también resistencia a otros antihelmínticos (47). *Loa loa* es una antigua filaria patrimonial del hombre, su área geográfica es exclusivamente del trópico boscoso centroafricano, coincidiendo con el área del tábano hospedador intermediario y transmisor. No hay de momento una hipótesis sólida sobre el mecanismo de esta incompatibilidad, sí únicamente que se produce en individuos con carga alta de microfilarias de *Loa* – 10-15.000 microfilarias/mL de sangre -. Ésta circunstancia se da solo en los super-portadores típicos de muchos parasitismos - piojos, tricuris ... - en los que la toda la población tiene una carga parasitaria leve, salvo unos pocos, emparentados, genéticamente adecuados, que soportan la mayoría de la carga. La detección de estas personas es fundamental para evitar los efectos colaterales, tanto a estas personas como a la campaña de control y erradicación de la oncocercosis (48).

Breve curriculum de los protagonistas de la ivermectina premiados

William Cecil Campbell

William Cecil Campbell, firma Bill, nació en Derry, y creció en Donegal en el noroeste de Irlanda, en 1930, tercer hijo de R.J. Campbell comerciante, proveedor de productos para granja, suministrador de electricidad a la localidad. Asistió al colegio Campbell al otro lado de la frontera, en Belfast y a la Universidad de Dublín, Trinity College, donde a los 22 años de edad se graduó con *suma cum laude* en Zoología, 1952. Ganó una beca de la fundación Fulbright para la Universidad de Wisconsin, USA donde realizó los trabajos sobre fasciolosis de su PhD, 1957, ingresando este mismo año en el Instituto Merck de Terapéutica experimental donde va a permanecer los 33 años siguientes hasta su jubilación de la empresa en 1990. Durante los seis últimos años ejerce como Científico superior y Director de Investigación y Desarrollo. Durante su tiempo de trabajo en Merck es asimismo profesor de parasitología en el N.Y. Medical College. Jubilado de la empresa se incorpora a tiempo completo como Asociado de Parasitología (Fellow) de la Universidad privada Drew, Madison, New Jersey, a cuyo profesorado pertenece durante los siguientes 20 años (1990-2010). Continúa vinculado a esta universidad como miembro del programa RISE (Instituto de Investigación para científicos eméritos). En 2002 es elegido miembro de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, en el 2008 recibe el premio a los Servicios Distinguidos de la Sociedad Americana de Parasitología y en 2012 su *Alma Mater*, el *Trinity College* de la Universidad de Dublín, le

nombra Doctor en Ciencias *honoris causa*. Le recibe su Canciller Mary Robinson, la que fue primera mujer presidente de la República de Irlanda.

Este el currículo formal, impersonal y descriptivo de la cadena de sucesos oficiales de su vida científica, nada dice o poco del científico, un parasitólogo brillante dedicado durante más de 30 años a la búsqueda de antiparasitarios, creando para ello un amplísimo abanico de modelos parasitarios de terapéutica experimental; algo así como una serie de cedazos por los que cerner los miles de moléculas, caldos de cultivo y extractos que los químicos y biólogos de la empresa ponen a su disposición. El cultivo de los nematodos parásitos es factible, se logró enteramente, desde huevo a huevo en los 60 del pasado siglo, pero es muy costoso e inoperante para el ensayo antihelmíntico. En los nematodos que utilizan el suelo como paso intermediario entre sus hospedadores la embriogénesis, la eclosión de las larvas de primer estado y éste y los siguientes dos estados larvarios suministran espacio para técnicas de ensayo antiparasitario, como lo son también, aunque más alejados de los nematodos parásitos aquellos de vida libre consumidores de bacterias, como el socorrido *Coenorhabditis elegans*. Cuando el ciclo exige el paso previo por un hospedador intermediario, un molusco, un artrópodo, el sistema se complica. Lo más sencillo, dentro de la complejidad, es disponer del ciclo completo, en condiciones de laboratorio, -- con animalario incluido y granja experimental provista de sistemas de aislamiento certificados--, donde mantener las especies representativas de las diferentes familias de nematodos, de los principales trematodos (*Fasciola*, *Schistosoma*, etc) y cestodos (*Hymenolepis*, *Echinococcus*, *Taenia*).

El trabajo para una Industria farmacéutica conlleva lógicas limitaciones para la publicación de resultados sensibles, no obstante, los trabajos originales y revisiones en solitario o en colaboración del Dr. Campbell son numerosos, y en particular, los libros en los que como editor reúne a los más destacados en los campos concomitantes de su interés prioritario: antihelmínticos bencimidazólicos, no en vano es el autor principal del proceso y difusión de estos fármacos, iniciado con el registro de Thiabendazole (tiabendazol en español), avermectinas y Trichinella. A este nematodo, un excelente modelo experimental por reunir en un mismo ciclo cuatro condiciones diferentes y consecutivas, que son individualmente, para otros nematodos, el núcleo vital al que hay que dirigir el antiparasitario, dedicó muchos de sus publicaciones y especialmente la que conocemos los parasitólogos como segunda biblia sobre Trichinella (49). La mayoría de sus publicaciones (55) son catalogables como de medicina veterinaria, versan sobre diferentes aspectos de la terapéutica antihelmíntica experimental de los animales domésticos. Es realmente un parasitólogo veterinario. Los trabajos dedicados a parasitismos animales superan en mucho a los dedicados a helmintosis humanas (19): uno más que los 18 de la oveja o los 12 del perro. Sus helmintos modelo más utilizados, además de *Heligmosomoides polygyrus* – el real descubridor, a su

pesar, de las avermectinas -, son: *Trichinella spiralis*, el más plástico de los modelos, *Dirofilaria immitis*, *Trichostrongylus axei*, *Ascaris suum*, los trichostrongílidos gastro-intestinales de rumiantes, estrongílidos de los equinos, ancilostómidos, filarias... etc.. Entre los antihelmínticos, protagonista fundamental de su desarrollo y/o descubrimiento: Tiabendazol (19 publicaciones) e Ivermectina (19 publicaciones). El descubrimiento y desarrollo de los bencimidazoles, surgido dentro de un programa de búsqueda de antivirales, se halló, en el cribado sistemático en los modelos experimentales – los estados libres preparasitarios de larvas de nematodos–, al observar la actividad de heterociclos aromáticos sintetizadas, como el ligando al cobalto (N-ribosil dimetil-bencimidazol) de la molécula de vitamina B12 (50), así nació el tiabendazol que aún se sigue usando como antifúngico y su descendiente el cambendazol de vida media más amplia, también desarrollado en su laboratorio y centro Merck de investigación; amen de los que, estimulados por estos trabajos, sintetizaron otras empresas farmacéuticas como Janssen (mebendazol y otros), SKF (albendazol), Hoechst (fenbendazol), etc., fármacos antihelmínticos únicos hasta el advenimiento de la ivermectina y derivados. Como parasitólogo es de destacar su continua participación en la ICT (*International Commission on Trichinellosis*). Seis veces a través de las sucesivas conferencias de la ICT desde 1968 hasta el 2000, incluida la celebrada en 1988 en Alicante que organicé junto con el Prof. Bolás, he coincidido con el Dr. Campbell en estas reuniones internacionales de expertos. Debo personalmente la Dr. Campbell su inestimable ayuda durante la elaboración en 1964 de mi tesis doctoral: el Dr. Campbell me mandó gratuitamente tiabendazol y las técnicas básicas de mantenimiento y experimentación con *Trichinella spiralis* (51).

Además de sus virtudes como investigador cuenta con grandes dotes de comunicador, de profesor que atrapa a sus alumnos con contenidos y humor salpicado. Es un irlandés, ciudadano USA desde 1962, que no ha renunciado a sus raíces, de amplísima cultura, pintor de motivos parasitológico y fino poeta. Sus breves poemas sobre parásitos formaron también el motivo de captura de atención y estímulo al aprendizaje; el ciclo de *Onchocerca* se recuerda siempre si como complemento al contenido denso, el profesor te recitó también un pequeño poema de su cosecha (primera cuarteta): *I don't need your goddem eye! all I need is a bit of skin/ big enough for me to scatter/ a few larvae in* (52).

Satoshi Ōmura

Satoshi Ōmura, 1935, es originario de la Prefectura de Yamanashi, región Honshu en la isla principal Chubu (al oeste de Tokio). Tras la habitual formación infantil y secundaria ingresa en la Universidad de Yamanashi, graduándose en ciencias en 1958, a los 23 años de edad. Prosigue sus estudios y obtiene el Máster en Ciencias en 1963. Por su destacada capacidad, al terminar su magisterio, es contratado como Investigador Asociado de

su propia universidad, puesto que desempeña hasta 1965 en que es contratado por el Instituto Kitasato de Ciencias Biológicas, centro de investigación perteneciente a la universidad homónima, en el que permanecerá los siguientes 43 años y en el que continúa como Profesor Emérito Distinguido y Coordinador especial del programa de descubrimiento de fármacos procedentes de productos naturales.

Completa su carrera desde el propio Instituto obteniendo en la Universidad de Tokio su PhD en Ciencias Farmacéuticas. Dos años más tarde obtiene su segundo grado de doctor, en este caso en la Química, PhD Universidad de Ciencias. Culmina así, a los 35 años de edad, su sólida formación biológica, farmacéutica y química. Además de su amplísima carrera investigadora es sucesivamente Profesor Asociado de la Universidad Kitasato (1968 a 1975), Profesor de la Escuela de Farmacia (1975 a 1984), Profesor del Instituto Kitasato de Ciencias de la Vida (2001-2007) y de la Escuela de Grado en Control de Infecciones (2002-2007); además es Profesor Visitante de la Universidad de Tokio (1991-2001) y en su estancia sabática durante dos años en USA, Profesor Visitante (*Tishler Professor of Chemistry*, nombramiento aún vigente y activo) de la Universidad Wesleyan (Connecticut). Como investigador en el Instituto Kitasato pasa por todos los niveles: Investigador, Jefe de Investigación del Centro de Funciones Biológicas del Instituto (1971-2001), Inspector (1981- 1984), Director (1990-2003) y Director y Presidente hasta el 2008 en el que alcanza su jubilación administrativa; 43 años de dedicación al centro, ahora emérito.

Su aportación científica es amplísima, con un extraordinario grado de difusión, alcanzando, si se consideran todas las aportaciones escritas de las diversas clases, desde libros a comunicaciones a congresos y reuniones profesionales, los aproximadamente 1.155 escritos. De la calidad de su obra, valga como ejemplo dos de sus tres primeras publicaciones en lengua inglesa: en la segunda Burg, et al (16), se describen las avermectinas y las características y denominación de la nueva especie de bacteria productora de estos antibióticos antihelmínticos, la tercera es un Nature sobre hibridación de *Streptomyces* y la producción de antibióticos híbridos, abriendo un campo pionero ; y así sucesivamente. Entre estos trabajos destacan las 140 conferencias invitadas donde resumía, a lo largo del tiempo de investigación personal, el estado actual y progreso de las líneas de investigación que dirigía, así como 42 libros, entre ellos, uno de obligada referencia “*Macrolide antibiotics: Chemistry, Biology and Practics*”, 1984; segunda edición 2012, Academic Press, NY. El profesor Ōmura es mundialmente reconocido como experto en química biorgánica, particularmente por el descubrimiento, desarrollo, biosíntesis y manejo de moléculas bioactivas producidas por microorganismos ambientales. Él mismo relata cómo su vocación nació siguiendo una clase en la universidad donde el profesor afirmaba con ejemplos, que los microorganismos que nos rodean, son capaces de sintetizar moléculas con estructuras

que nunca podíamos imaginar e incluso reproducir. Así lo persiguió y ha demostrado a lo largo de su amplísimo currículo: los microorganismos producen compuestos, muchos de ellos capaces de mejorar el bienestar, prosperidad y salud del hombre y animales útiles; ahí están, esperando ser descubiertos. Los microorganismos son los más justamente merecedores del premio que ahora se me otorga, dice con fina ironía. Este fue el motivo principal de su trabajo desde los primeros años de posgraduado investigando en fermentaciones vitivinícolas y posteriormente en antibióticos diversos en el Instituto Kitasato. También desde el principio entendió y puso en práctica nuevos métodos: protocolos de aislamiento nuevos, nuevos sistemas de cultivo, nuevos métodos de ensayo de detección y evaluación de la actividad biológica de los metabolitos. Fruto de este trabajo son los 13 géneros nuevos de microorganismos descubiertos, entre ellos *Kitasatosporia*, *Longispora* y *Arbophoma* con 42 nuevas especies. Procedentes de todo este abanico de nuevas especies, descubre, aísla e identifica molecularmente 470 compuestos orgánicos con bioactividad de algún tipo, con estructuras químicas novedosas, sin precedentes, muchas de ellas con capacidad antibiótica: 26 de uso directo o por derivados semisintéticos de los mismos, en medicina humana y animal o como promotores de crecimiento, herbicidas, además de reactivos para el estudio de funciones bioquímicas celulares.

Antes de su participación en el descubrimiento de las avermectinas había descubierto un antibiótico inhibidor de la biosíntesis de los ácidos grasos, estructura básica que condujo a otros al descubrimiento de las estatinas; continúa usándose como reactivo en estudios de la bioquímica de los lípidos. Dentro de una línea inicial de aislamiento de alcaloides procedentes de fermentaciones bacterianas, descubre Staurosporina, que posteriormente se reconoció inhibidor de proteína-quinasa C, abriéndose así la posibilidad de aislamiento de antibióticos anticancerosos. De este antibiótico se derivan fármacos antitumorales como Imatinib y Gefitinib.

Como se comentó con anterioridad, la colaboración con Merck originó el desarrollo por los investigadores de esta empresa de las avermectinas. El Prof. Ōmura es un excelente golfista y fue del margen de la calle del campo de Golf de donde tomó la muestra de tierra de donde aisló y cultivó la bacteria que enviada a Merck sirvió, como antes se describió, para descubrir las avermectinas, los antibióticos activos frente a nematodos y artrópodos. Posteriormente ha realizado numerosas investigaciones sobre el genoma de *Streptomyces avermitilis* identificando los genes responsables de los numerosos metabolitos secundarios que produce esta bacteria, además de los 17 genes responsables de la producción de las avermectinas. Muchos de los conocimientos y desarrollo de la relación entre estructura y actividad de macrólidos tales como leucomicina, tilosina, espiamicina, eritromicina, se deben también a Ōmura y su grupo. Derivados de la leukomicina, como la rokatamicina y de tilosina, tilmicosin llegaron a la medicina humana; Tilosina se sigue empleando en

medicina veterinaria. Otros antibióticos descubiertos actúan como inhibidores enzimáticos con actividad antitumoral: herbicidina inhibidor de Hsp-90; lactacistin del proteosoma. Otros, como los derivados de piripropeno son insecticidas. Varios de estos productos se desarrollan gracias a proyectos conjuntos entre el Instituto Kitasato con sus investigadores liderados por el Profesor Ōmura e industrias farmacéuticas de Japón, Estados Unidos, Alemania, etc.

Su amplísima carrera científica ha sido reconocida en el mundo entero siendo admitido como Doctor *honoris causa* en varias universidades: Lajos Kossuth de Hungría, 1991; Westleyan (Connecticut), su otra alma mater, en 1994. Así como académico de número o correspondiente en un gran número de corporaciones: Academia Alemana de Ciencias (Leopoldina), 1992; Academia Americana de Microbiología; Academia de Ciencias (Instituto de Francia), 2002; Academia Rusa de Ciencias, 2004; Academia Europea de Ciencias (Bélgica), 2005; Academia USA de Ciencias, entre otras y más destacadas. El premio Nobel que recibe en 2015 no es más que la cima de un conjunto de reconocimientos previos: Medalla de oro Robert Koch (Alemania); Premio Charles Thom (Sociedad de Microbiología Industrial, USA); Premio Príncipe Mahidol (Tailandia); premio Nakanishi de la Sociedad japonesa de Química, ídem de la Sociedad Americana, de la Sociedad americana de Productos Naturales (Ernest Guenther) y de la Sociedad Internacional de Quimioterapia; Premio Arima; de la Academia del Japón y Al Mérito Personal en Japón; Premio Gairdner canadiense de Salud Global (53), (54), (55).

SEGUNDA PARTE DEL NOBEL 2015

... and the other half to Youyou Tu “for her discoveries concerning a novel therapy against Malaria”

Introducción 1. Esbozo del paludismo

El paludismo o malaria es la enfermedad parasitaria más importante de las que afligen al hombre. Aunque no la más abundante, sí es la que más años estimados de vida saludable arrebató a la especie humana, es decir, la que más dolor, incapacidad y muerte ocasiona entre las enfermedades infecciosas. La causan cuatro especies de protozoos parásitos patrimoniales – antroponóticas – del hombre: *Plasmodium malariae* (fiebres cuartanas), *Plasmodium vivax* y *P. ovale* (tercianas) y *P. falciparum* (terciana maligna, cotidiana), además de una especie zoonótica, *P. nowlesi* compartida con simios. Asociada esta enfermedad a las condiciones climáticas que permiten el desarrollo de sus hospedadores y vectores intermediarios, especies de mosquitos hematófagos del género *Anopheles*, su prevalencia fue sólo estacional en los climas fríos y templados y continúa siendo permanente, dependiendo de la pluviosidad, en la gran faja terrestre intertropical.

Cuando éramos, hace unos pocos años, 6000 millones de personas las estimaciones de prevalencia/demografía de la malaria se cuantificaban así: unos 1690 millones (el 28%) viven en áreas donde nunca hubo malaria endémica;

unos 960 millones (16%) vivimos en zonas donde se erradicó la malaria hacia la mitad del siglo XX; un 66% de la población mundial vive en áreas bajo riesgo de contraer malaria, entre las cuales un 48 % (2880 millones) viven en países donde se está controlando con mayor o menor fortuna el proceso y aún resta un 8% de población poco o deficientemente atendida.

Por primera vez en la historia, un poderoso tridente sanitario sujeta el paludismo: mosquiteros de camas e interior de las viviendas tratados con insecticidas persistentes y de contacto, sistemas sencillos de diagnóstico rápido y tratamientos eficaces fáciles de aplicar. Gracias a todo ello, junto con la educación sanitaria y el esfuerzo económico altruista de entidades públicas y privadas, fundaciones, ONG, etc. se avanza, por segunda vez, hacia el control universal y la erradicación, área a área, de la enfermedad. Así, la tasa mundial estimada de incidencia de casos de paludismo disminuyó en un 30% entre 2000 y 2013, y la de mortalidad en un 47%. La OMS (56) calcula que en este 2015 habrá unos 214 millones de casos de paludismo en todo el mundo (intervalo de incertidumbre: entre 149 y 303 millones) con 438 000 fallecimientos a causa de la enfermedad (entre 236 y 635 000), la mayoría niños menores de cinco años y en África subsahariana principalmente.

De 106 países en los que seguía habiendo transmisión del paludismo en el año 2000, 64 han alcanzado la meta de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, consistentes en empezar a reducir la incidencia de la enfermedad. De esos 64 países, 55 están en camino de alcanzar la meta para el 2015 de la Asamblea Mundial de la Salud y de la Iniciativa para Hacer Retroceder el Paludismo (RBM, *roll back malaria*) consistente en reducir la tasa de incidencia del paludismo en el 75% de la población de las áreas endémicas (57).

Pese a estos enormes progresos, aún queda mucho por hacer. En 2013, se lograron fondos sólo para financiar el 53% de los 5100 millones de US\$ anuales que se consideran necesarios para alcanzar las metas mundiales. Millones de personas en riesgo de padecer la enfermedad siguen sin tener acceso a las tres intervenciones antes citadas. En consecuencia, cada año hay 198 millones de casos (intervalo de incertidumbre: 124-283 millones) y 584 000 muertes (intervalo: 367 000-755 000). Es un proceso que no se puede detener, el esfuerzo debe continuar con la misma o renovada intensidad. Es este un problema solucionable, un paso atrás y todo el esfuerzo de años se vendrá abajo.

El recurso terapéutico sencillo, eficaz y único en la práctica es artemisinina (TCA) combinada en un solo comprimido con un antimalárico de vida media prolongada. La mitad del Premio Nobel de Fisiología o Medicina se concede en este 2015 a los numerosos investigadores, personalizados en Youyou Tu descubridores de este nuevo fármaco procedente de un viejo remedio, de una planta medicinal.

La malaria ostenta bajo el punto de vista terapéutico varios record, es la primera enfermedad infecciosa que se

trató eficazmente siglos antes de conocerse los agentes causales, con sustancias naturales químicamente definidas (los alcaloides quinina y quinidina) y con la primera molécula de síntesis, azul de metileno. También es la primera enfermedad infecciosa, que tras un relativamente corto periodo de tratamiento mediante fármacos de síntesis, inutilizados por la resistencia inducida en los protozoos causantes, vuelve, como empezó, a tratarse con un producto natural, artemisinina, aislada de una planta medicinal.

Introducción 2. Los antimaláricos y las guerras

El tratamiento de las fiebres intermitentes (tercianas y cuartanas) lo descubren médicos españoles en Perú hacia 1632. La quina primero y la quinina posteriormente son el remedio imprescindible durante los siguientes 380 años (al menos 250 de los mismos en exclusiva) hasta la primera fase de la guerra civil europea del siglo XX (1ª Guerra Mundial), salvando millones de vidas y permitiendo la colonización del trópico. Lo que es más importante, sin que se hayan producido resistencias radicales, pues cuando en lugares como el Sudeste asiático – la cuna de toda las resistencias – disminuye un tanto su eficacia, basta asociarla a una tetraciclina (doxiciclina) para resolver paludismos clínicamente graves (57). La quinina además tiene dos méritos añadidos, los primeros intentos de síntesis, fallidos como el del inglés William H. Perkins dieron lugar al descubrimiento de las primeras anilinas en Inglaterra y en Alemania, las anilinas permitieron también el desarrollo de la microbiología y protozoología y la intuición de Paul Ehrlich: si el azul de metileno teñía tan bien a los protozoos de la malaria, si esta capacidad se mantuviera en vivo, la anilina mataría al parásito y, efectivamente, en 1891 Ehrlich y Guttman curan a dos maláricos con azul de metileno (58). Había nacido la quimioterapia de los procesos infecciosos.

La quina fue siempre una droga estratégica, transportada hacia Europa y Norteamérica desde sus lugares de extracción, América del Sur hasta finales del XVIII y cultivo, islas de Indonesia durante el Siglo XIX y el primer tercio del XX (monopolio holandés del *Duch Kina Institute*) (59). Como consecuencia de la 1ª Guerra Mundial, el corte marítimo de suministros, empujó hacia la búsqueda de moléculas de síntesis con actividad antimalárica y ante la incertidumbre de disponer en caso de guerra de suficiente quina se crea en Alemania en 1925 la IG Farben (comunidad de intereses de fabricantes de colorantes) asociando a las industrias Bayer, BASF, la que más tarde se denominó Hoechst, AGFA y otras varias, que instauran el Centro de Investigación de Elberfeld, anejo a Bayer. Este centro, hasta 1950 en que se disuelve en la postguerra de la 2ª Guerra Mundial, realiza en relación con el paludismo una obra titánica cribando y sintetizando moléculas (hasta 10.000 probablemente, no se conoce) (60) que sustituyeron a la quinina: mepacrina, 1932 (registrada como Atebrina® en Alemania), quinacrina, 8-aminoquinolinas y las 4-aminoquinolinas, entre las cuales resochin, renombrado como cloroquina, sirvió como el

remedio definitivo para la prevención y el tratamiento del paludismo los siguientes veinte años⁵⁴. No es objeto esta revisión del análisis de las causas de la rapidísima extensión de la resistencia establecida a la cloroquina a partir del centro americano – valle del río Magdalena en Colombia – y del sudeste asiático, sí sin embargo hacer énfasis en la relación entre las guerras y el desarrollo de los antimaláricos: la guerra de secesión americana no hubiera tenido ni vencedores ni vencidos a no ser por la quinina, en la 2ª guerra mundial la mepacrina en sus diversas denominaciones, a pesar de sus efectos secundarios, protegió contra la malaria en uno y otro bando europeo y asiático; la sucesiva guerra de Corea contó ya con la cloroquina, con protección casi total pero el problema volvió a surgir en la larga guerra de Vietnam 1955-75.

Introducción 3. “No hay mal que por bien no venga”

Así reza el refrán castellano. Veamos. Hacia 1960 había en la península indochina dos contendientes: ejército de Vietnam del Sur, apoyado por el de los USA, y el Vietcom de Vietnam del Norte, apoyado por China y la URSS, dos ejércitos enfrentados y un enemigo común, *Plasmodium falciparum*, resistente a cloroquina. No conocemos datos citables de las bajas entre el ejército comunista y la población civil durante la guerra, sí alguno más del ejército americano. En el momento álgido de la guerra el 1% de los soldados USA causaban baja diariamente del servicio por malaria; en 1965, en la primera división de caballería en el Altiplano Central, el 35 % de los soldados adquirieron malaria. En 1967 el 50 % de los soldados que participaban en operaciones en los valles Drang y Vinh Thanh (61). En la marina, 24.606 casos de malaria y unos 391.256 días de baja médica por la enfermedad, aunque con un número pequeño de fallecimientos, menos de 100 soldados (62). En el ejército entre 1965 y 1970 se produjeron unos 40.000 casos, con unas 78 muertes; la malaria causaba más morbilidad que las balas (63). Ante esta situación reaccionaron ambos contendientes. Los americanos emprendieron a través del WRAIR (Instituto Walter Reed de investigación del ejército) un programa de búsqueda de nuevas moléculas activas utilizando como medio de cribado primario el método Peters de pervivencia al 4º día del ratón infectado con una cepa patógena de *Plasmodium berghei* (64). El programa se inició en 1960 y cribó unas 250.000 moléculas. La selección fue aparentemente escasa, sólo dos moléculas, un fenantreno-metanol posteriormente denominado halofantrina, seleccionada en la prueba 177.669 y una entre 300 quinolinmetanol con cierta actividad, la 142.490 del protocolo de cribado. Como el instituto no puede por ley comercializar directamente ningún producto, además de realizar los ensayos clínicos hasta llegar a su empleo en las fuerzas armadas, para difundirlos como alternativa necesaria a los demás antipalúdicos ya obsoletos, el WRARI concertó convenios con Hoffman- LaRoche y SKF-Beecham que los llevaron al mercado. La halofantrina llegó al mercado con el

nombre de Halfan® y su tiempo activo fue muy corto. Es un buen tratamiento vía oral, eficaz, pero pronto demostró en su empleo masivo efectos secundarios incontrolables, con biodisponibilidad errática y cardiotoxicidad potencialmente fatal, además de incompatibilidad grave con mefloquina. Dejó de ser recomendada por la OMS y se retiró del mercado. La quinolinmetanol, mefloquina, con el nombre de Larian® se empleó en las fuerzas armadas de modo permanente. Presenta también de modo esporádico efectos secundarios de comportamiento: suicidios, trastornos neuropsiquiátricos (65). Es un buen preventivo, un único comprimido semanal. Se mantiene entre la escasa oferta terapéutica.

El proyecto 523

El otro grupo de contendientes, el gobierno comunista del Vietnam del Norte acudió a su aliado China solicitando ayuda, lo que fue atendido. No hay demasiados datos porque en principio el trabajo estaba sometido al sigilo militar y sus resultados fueron largamente secretos. Además, las pocas publicaciones iniciales no tenían autor y se escribieron en lengua china mandarín, dificultad añadida al clásico poco aprecio a lo que hasta entonces procedía de estas fuentes. Pero los resultados de este esfuerzo, informan la lucha y el control antipalúdico actual en el mundo entero. Estas tres iniciativas son: a) tratamiento combinado, b) forma farmacéutica como comprimido con todos los componentes integrados, c) el uso de una droga (artemisinina, extraída de una planta medicinal) o sus moléculas semisintéticas.

Para atender la lamentable situación ante el paludismo de las tropas Vietcom, el Jefe Supremo Mao Zedon (Mao Tsé-tung) y el Primer ministro Zhou Enlai, convocaron una amplia reunión de científico el 23 de mayo de 1967 para definir los objetivos a cubrir frente a la malaria. De esta primera reunión surge el Proyecto secreto 523 (por el mes y día en que inicia su trabajo) que va a contar con dos tipos de objetivos: a) objetivos a corto encaminados a resolver del modo mejor posible el problema actual del paludismo entre los combatientes aliados; b) objetivo a largo plazo, dirigidos a buscar o crear nuevos principios activos con los que prevenir o curar la malaria (66).

El objetivo a corto plazo es disponer de los métodos y medios más sencillos para prevenir la infección entre los soldados. Se deciden por seguir tres normas: combinar fármacos sinérgicos, en un solo comprimido, en una sola toma, semanal al menos.

Conocen bien el estado de resistencia de *P. falciparum* y *P. vivax* y deciden explotar los sinergismos probados de los antifolatos, inhibidores del ácido tetrahidrofólico. Esta molécula juega un papel insalvable en la biosíntesis de los nucleótidos de timina y purina – formadores de ADN y ARN -- y varios aminoácidos: histidina metionina, serina, glicina. Mientras que en el hombre tiene que proceder del alimento, los parásitos de la malaria lo sintetizan, tomando además la del propio hospedador. La inhibición de dos enzimas clave de la ruta de la biosíntesis del folato, DHFR (reductasa de dihidrofolato) y DHPS (sintasa de

dihidropteroato) habían sido usadas largamente por su acción antiapicomplejos – el mismo grupo al que pertenecen los causantes de la malaria- así como contra bacterias y había sinergismo útil probado para la prevención y tratamiento de la malaria en África entre sulfamidas que inhiben DHPS e inhibidores de DHFR como pirimetamina⁵⁴. Por otra parte, conocían la poca utilidad que le restaba a la cloroquina por lo que habían sintetizado moléculas variantes de cloroquina capaces de evitar la resistencia adquirida a la misma. Con estas bases diseñan, para según el tipo de misión militar tres tratamientos profilácticos: 1. Profilaxis para 7 días (comprimido con pirimetamina mas dapsona), 2. Profilaxis para 10 días (pirimetamina mas sulfadoxina), 3. Profilaxis para 30 días (sulfadoxina mas piperaquina) – la piperaquina es una 4-aminoquinolina dimérica, activa frente a plasmodios cloroquin-resistentes –. Todos los métodos se ensayaron sobre el terreno, con los soldados y guerrilleros como sujetos. Tuvieron un éxito fundamental librándose los combatientes, que al final se alzaron con la victoria, de la lacra del paludismo.

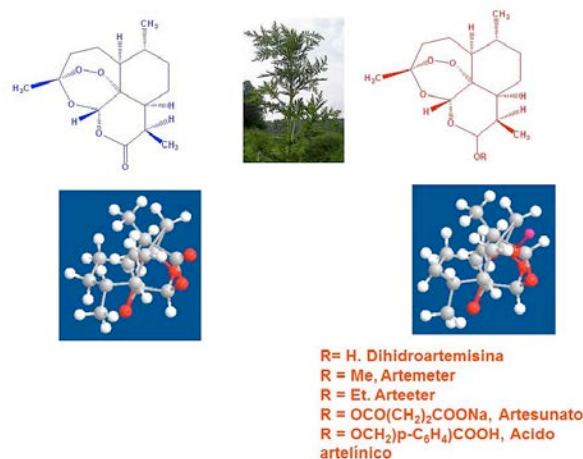
El objetivo a largo plazo tuvo desde el principio dos metas diferentes: a) análisis crítico de los métodos tradicionales; b) proseguir bajo la dirección de la Academia de Ciencias Militares de Pekin, y departamentos universitarios a lo largo del país, la síntesis y evaluación de nuevas moléculas de síntesis.

Poyecto 523. Análisis crítico de los métodos tradicionales

En la Academia de Medicina Tradicional, en los sucesivos proyectos posiblemente dirigidos por la Dra. Youyou Tu se centró el esfuerzo de numerosos equipos a lo largo del país formados por la asociación de expertos en medicina tradicional con médicos, químicos, analistas, farmacólogos, parasitólogos con formación occidental. Sometieron sistemáticamente a un análisis crítico que finalizaba en el modelo parasitario de terapéutica antimalárica ratón/*Plasmodium berghei*, a todas las recetas de productos naturales prescritas en la literatura china contra las fiebres, así como los remedios que empleaban los médicos tradicionales chinos, humildes y renombrados, del Sur y Suroeste de China e islas adyacentes con malaria endémica. Un trabajo sistemático que condujo a la selección prioritaria de dos especies vegetales muy empleadas contra las fiebres en general denominadas yingzhao (*Artabrotys hexapetalus*) y qinghao (*Artemisia annua*)⁶⁰. La raíz de la primera de estas plantas era usada en la medicina popular como antipalúdico y otras partes de la planta para el tratamiento de otros procesos. La segunda, un ajenjo, pertenece a un géneros conocido en el mundo entero como remedio para varias dolencias, no en vano se le denominó Artemisia, como la reina Artemisia II de Caria (67), 350 a JC, experta en las virtudes de las plantas. “Madre de las hierbas” se denomina a una de las especies (*Artemisia absinthium*) (68), así como otras especies empleadas en múltiples usos, como antihelmético desde Dioscórides, como tónico, febrífugo, antihelmíntico. Qinghao (*A. annua*) era usada de modos diversos por la

medicina popular, incluyendo la ingestión directa de las hojas verdes junto con azúcar moreno para tratar paludismos y diversas preparaciones como infusión en agua hirviendo de hojas secas de la planta, lo que se incluía en la farmacopea china, aunque de modo impreciso ya que indistintamente se refería a dos especies, *A. annua* y *A. apiacea* :” infusión en agua hirviendo de 4,5 a 9 g de planta seca, diarios, para el tratamiento de la fiebre y el paludismo”. Figuraba además en viejos documentos como el apartado médico del escrito sobre tela de seda rescatado en 1973 de una de las tumbas del yacimiento arqueológico Mawangdui de la dinastía Han anterior u Occidental, titulado “Cincuenta y dos recetas” (69), fechado en el 168 a.C. en el que se cita a la planta como remedio antihemorroidal – como en el Dioscórides del Siglo I (70) en Occidente -- y específicamente como tratamiento de las fiebres en obras posteriores como el tratado para automedicarse de Ge Hong (283-343) *Manual de recetas para tratamientos de urgencia*, en el tiempo de la dinastía Jin (265-420) y en el más reciente de Li Shizhen (1518-1593) *Compendio de Materia Médica* escrito durante la dinastía Ming.

En el laboratorio de Youyou Tu encuentran resultados esperanzadores – descenso del parasitismo hemático de hasta el 68 % a veces, pero inconstantes (12 a 40% en muchos casos) lo que no se debía a la concentración dado la escasa reproductibilidad del efecto dentro del mismo lote de planta, en ocasiones la extracción perdía toda su actividad antipalúdica. Narra la propia autora ahora premiada (71), que ante estos hechos comenzó a revisar cuidadosamente los antecedentes escritos en los tratados de materia médica y sus datos recopilados durante su estancia en la provincia de Yunnan, durante la primera fase del proyecto 523, sobre el uso de la planta en la medicina popular y por los curanderos de las zonas palúdicas. La solución vino de la lectura del manual de Ge Hong. En la página que se refiere a las fiebres, en la versión de 1574 en una línea vertical, dice al parecer: “ toma un puñado de qinghao macerado en dos sheng de agua (un sheng equivale a unos 400 mL), colar y beber todo el jugo” – para combatir las fiebres intermitentes. Aquí podía estar la clave: la extracción de la droga activa era mediante maceración en frío, justamente lo contrario a lo habitual, extracción en agua en ebullición. Tras ensayos con solventes apolares, descartando la extracción hidroalcohólica inicial, y comprobando la toxicidad y actividad de las fracciones en el modelo experimental, aísla una porción neutra y atóxica, extracto 191, que resulta 100% activa frente a *Plasmodium berghei* en ratones y *P. cynomolgi* en monos. El 4 de octubre de 1971 es, indica Youyou, la fecha de partida del descubrimiento de la droga. Todo el trabajo se centró en el aislamiento de los principios activos en el extracto, así en 1972 aislaron de modo reproducible una sustancia químicamente definida de 282 Da con punto de fusión 156-157 °C y fórmula C₁₅H₂₂O₅ como principio activo, que denominaron qinghaosu (una palabra compuesta de *qing*+*hao*, designa la planta medicinal artemisia verde o las hojas de la planta



y el sufijo *su*, la propiedad de o el componente de), o artemisinina, posteriormente. Otros equipos, aunque siempre después de este tiempo, la denominaron también “huanghuahao” (flor amarilla de la planta medicinal), cuando lo que se utilizaba era el extracto activo de la planta en flor.

Youyou Tu presentó sus resultados en el Encuentro del proyecto 523 que tuvo lugar en Nanjing el 8 de marzo de 1972, explicando la metodología precisa de la extracción y la cristalización del producto activo del extracto 191. A consecuencia de esta comunicación, dos equipos, el del Instituto Yunnan dirigido por el Dr Zeyuan Luo y el Shandong dirigido por el Dr. Zhangxing Wei, usando la información comunicada por Youyou Tu, procedieron a extraer y cristalizar la droga, demostrando su gran actividad a dosis muy bajas.

Al parecer, en estas fechas, en plena Revolución Cultural (1966-76) en la que hasta los científicos podían ser mal vistos, lo eran de hecho cuando se les catalogó como en la época mongol como los penúltimos, después de las prostitutas y justamente antes de los mendigos en la escala social - no era posible iniciar un Ensayo Clínico normal por lo que lo sustituyeron por un sucedáneo de urgencia. Comprobaron en ellos mismos – Tu y su equipo - la no toxicidad para el hombre del extracto y realizaron en el otoño de 1972 un ensayo corto sobre 30 enfermos palúdicos: 20 positivos a *P.vivax* y 9 a *P.falciparum* y uno más con infección mixta. El resultado del ensayo fue alentador, los enfermos de tercianas cesaron en sus síntomas a las 19 horas, los infectado con la terciana maligna a las 36 horas. El éxito de los ensayos sobre pacientes condujo a que otros laboratorios como los mencionados: Instituto Yunnan de Materia Médica China, en la provincia limítrofe con Vietnan y el de Shandong de Medicina Tradicional y Materia Médica (China)- Centro-Este costero - realizaran extractos y aislamientos del principio activo con las variedades de *A.annua* de sus lugares. Los resultados de los tratamientos de pacientes palúdicos fueron diferentes, mientras que prácticamente fracasaron los elaborados en Pekín con unos comprimidos llamados qinghaosu II, tuvieron un rotundo éxito los elaborados en los otros territorios. Concluyó el año 1973

en medio de una cierta confusión por lo que en el siguiente año, tras dos reuniones de los institutos implicados llegaron a dos conclusiones fundamentales: que no todas las *A.annua* eran iguales, las había con pobre contenido en principio activo como la que se cultivaba en el entorno de Pekín o mucho muy ricas como las de la provincia sureña de Yunnan; que en todos los laboratorios se había aislado el mismo principio activo, y, que la forma galénica era importante, así, los comprimidos hechos con la vieja maquinaria en Pekín, no eran adecuados por su mala disgregabilidad y sí sin embargo la aplicación de qinghaosu en cápsulas. En el siguiente año, con la colaboración del Instituto de Biofísica de la Academia China de Ciencias se determinó la configuración molecular cristalina por rayos X (1975) y la configuración absoluta mediante rayos X difracción anómala (1976). Publicándose en sendos trabajos en chino en 1977 y 1979 (72). En este mismo año 1976 el Comité Nacional Chino de Ciencia y Tecnología reconoció a la Dra. Tu como descubridora de la artemisinina y su eficacia antipalúdica⁷¹. Realizan la farmacología, farmacocinética y toxicología del producto y obtienen por semisíntesis sus derivados. Demuestran asimismo que la única especie que tiene artemisinina en sus hojas, con máxima concentración al comienzo de la floración, es *A.annua* entre las múltiples especies del género y comienzan la selección de variedades de acuerdo con su rendimiento, así como la estandarización del cultivo, suelo, abonos, etc.; en años posteriores crean híbridos interespecíficos, estériles, de alta producción, para cultivos industriales y exportación de semillas.

La salida real desde China del nuevo antimalárico lo propicia la celebración en Pekin, 1981 en la sede de la Academia de Medicina Tradicional China, del 4th Meeting del Grupo Científico de Quimioterapia de la Malaria bajo los auspicios de la OMS con la colaboración de UNDP (programas de desarrollo de las NU) y el Banco Mundial, en el que diversos autores locales relataron los resultados del tratamiento del paludismo con artemisinina y la Dra Tu las características químicas de la molécula y alguno de sus derivados.

Artemisinina

Es la denominación oficial adoptada, que sustituye a las dos iniciales qinghaosu y huanghuahao. Frecuentemente el nombre artemisinina se abrevia como artemisina, lo que es incorrescto ya que artemisina es el nombre del antihelmíntico derivado de otras especies de artemisia (73). Las artemisininas son una familia de trioxano lactonas sesquiterpenas, dotadas de un raro puente endoperóxido esencial para su actividad antimalárica y de otros usos (figura 2). La molécula básica tiene escasa solubilidad tanto en agua como en aceite por lo que conservando la estructura se diseñaron una serie de derivados: la reducción de la lactona produce el hemiacetal *dihidroartemisinina* (**H**), la alquilación del hemiacetal da lugar a *arteeter* (**CH₂**) y *artemeter* (**CH₂-CH₃**); por acilación del hemiacetal **OH** con ácido succínico se

produce una molécula soluble en agua, con mejor perfil farmacológico, oral y parenteral, artesunato ($\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{COONa}$), etc. La artemisinina y sus derivados son poderosamente activos frente a la esquizogonia hemática, incluso frente a la fase inicial de anillos, lo que no sucede con otros antipalúdicos, y son también moderadamente activos frente a los gamontes (pre-gametos hemáticos). Su acción produce una disminución de diez mil veces menos merozoitos hemáticos en cada ciclo esquizogónico, por lo que la remisión de los síntomas es más rápida que la producida cuando se empleaban otros fármacos. Su vida media es muy corta, de horas, de ahí que si no se reitera el tratamiento (durante 5 a 7 días) son frecuentes las recrudescencias, razón por la que, además de perseguir retrasar o impedir la aparición rápida de resistencias, se asocia simultáneamente a otros antipalúdicos de más larga vida media, actuantes por lo tanto después de la eliminación de la artemisinina. El metabolismo hepático del fármaco a través del citocromo P450 (CYP2B6) es muy rápido, pasando a dihidroartemisinina, molécula con varias veces mayor actividad, pero efímera pues rápidamente por hidroxilación y glucoronización se transforma en una molécula altamente soluble y eliminable en menos de una hora postratamiento, principalmente por la orina. La artemisinina induce la actividad del citocromo de tal modo que el catabolismo de la siguiente dosis del fármaco es más rápido todavía y su vida media sérica menor, razón también para asociar este fármaco a otros antipalúdicos preferentemente con dianas farmacológicas distintas. Si se utilizara sola cabe siempre la posibilidad de recrudescencia a partir de las poblaciones originadas por la suelta desde el hígado infectado con *P. falciparum* de nuevos merozoitos cargados con merozoitos hepáticos recreadores de nuevas esquizogonias hemáticas (recrudescencias).

Bajo el punto de vista farmacéutico, aunque existen registros de medicamentos éticos con arteeter, poco numerosos y muchos con artemeter, la tendencia es a la manufactura de tratamientos combinados dispuestos en un solo comprimido de fácil ingestión. El problema básico de la asociación es que debería ser con un fármaco para el que no se hubieran producido resistencias previas, pues se anula el doble efecto buscado: impedir las recrudescencias y retrasar la aparición de resistencias. Así ocurre que el combinado Coartem® o Riamet® ambos formados por artemeter mas lumefantrina, cuenta con alargamiento en el tiempo de cura de paludismos, sino fracasos por resistencia, en el foco de todas las resistencias, la frontera entre Tailandia y Laos. En este lugar había antes de la introducción de Coartem una alta resistencia a mefloquina y la lumefantrina es un fármaco del mismo grupo, estructuralmente similar. Por esta causa el resultado de estos TCA (tratamiento combinado de artemisinina) como Coartem son más eficaces en África. Por ello PYRAMAX (pironaridina + artesunato) del lab. coreano Shin Poong, puede ser una buena alternativa. Por esta razón, entre otras, el TCA de artesunato y mefloquina (ASMQ desarrollado

en Brasil; Instituto Oswaldo Cruz/Farmaguignos y apoyado por DMDi – iniciativa de fármacos contra enfermedades desatendidas) está siendo muy útil en Iberoamérica donde la mefloquina había sido menos utilizada. Otras combinaciones registradas son con amodiaquine (ASAQ), piperaquine (Duo-Cotecxin).

Como monofármaco, para el paludismo, sólo se emplea artesunato por su solubilidad y las posibilidades de uso por vía endovenosa o rectal, las únicas posibles en los paludismos agudos con implicación cerebral, compitiendo con quinina.

Artemisinina 2. Modo de acción

Brevemente, a pesar del enorme trabajo experimental realizado, creándose modelos de ensayo en levaduras y en otros apicomplejos, aún no hay acuerdo total en la diana morfológica y bioquímica de artemisinina sobre la esquizogonia hemática de *Plasmodium*. Sí que hay muy buenas revisiones de las que se extraen lo que a continuación se menciona (74),(75),(76),(77),(78), (79).

Si existen algunos hechos demostrados de modo indubitable, tales como: a) que el puente endoperoxido es el elemento esencial de la molécula; b) que las dianas morfológicas del fármaco son múltiples: vacuola digestiva, retículo endoplásmico y mitocondria – los apicomplejos sólo tienen una mitocondria por célula (merozoito) y sólo tantas mitocondrias como merozoitos va a formar el esquizonte – con alteración estructural de sus membranas – arrugamiento - apreciable mediante microscopía electrónica de transmisión; c) que se produce una parálisis del ciclo celular del parásito que estaba iniciando o realizando una división múltiple por exogemación, llamada esquizogonia, entrando en apoptosis.

Las dudas surgen en los resultados a veces contradictorios o difíciles de extender cuando se compara la actividad en plasmodios con la que se produce frente a otros apicomplejos, también hemáticos no consumidores de hemoglobina como *Babesia* spp. o parásitos de cualquier célula del organismo salvo, entre otras, los glóbulos rojos, como es el caso de *Toxoplasma gondii*; asimismo cuando se trata de explicar su potente actividad antitumoral.

Bajo el punto de vista bioquímico y funcional, hay discrepancias interpretando cual es el comienzo del fenómeno, si la vacuola, si el retículo y la mitocondria a continuación y como consecuencia de la acción sobre la vacuola digestiva. Parece que hay consenso en considerar que el hierro como Fe^{++} , juega un papel importante en su activación. Los merozoitos que penetran activamente en los eritrocitos, quedan instalados en el interior de una vacuola parasitófora eritrocítica y comienzan, tras la fase inicial de anillo, a ingerir hemoglobina, creando así espacio para crecer mientras se nutren. La hemoglobina ingresa por fagocitosis y queda envuelta en su caminar hacia la vacuola disgestiva en una doble membrana – interna de la pared de la vacuola parasitófora del eritrocito y externa de la membrana citoplásmica del propio parásito –. La disolución de la membrana interna proporciona el ambiente fisicoquímico que propicia la separación de la

hemoglobina en sus dos componentes, el hemo y la globina. La globina es la fuente de los aminoácidos que necesita el parásito, pero el hemo (feriprotoporfirina IX Fe^{++}) es un poderoso tóxico por lo que es polimerizado y cristalizado formando hemozoina –el pigmento negro malárico-. La polimerización, fisicoquímicamente entendible, no se conoce bien y se supone que debe de ser mediada por proteínas que hacen el papel de hemopolimerasas como la HRP-2 (proteína rica en histidina, conocida inicialmente por su utilidad en el diagnóstico de la malaria). Por esta causa hay hierro ferroso (Fe^{++}) en la vacuola digestiva y el citoplasma fuera de la vacuola. Se piensa que este hierro se asocia a la artemisinina y por transferencia electrónica corta por reducción el puente endoperoxido produciendo radicales de oxígeno que se acomodan a radicales de carbono. Se sugiere que este proceso puede producirse por dos vías diferentes, que no son entre sí excluyentes, dada la naturaleza asimétrica del puente endoperoxídico de la artemisinina. En un caso atacando el Fe^{++} al O_1 ocasionando un radical centrado en carbono primario Fe^{+++} , en el otro atacando el Fe^{++} al O_2 y dando lugar al radical centrado en carbono secundario Fe^{+++} ; se ha comprobado analíticamente la presencia de ambos. Además de esta interpretación también se ha sugerido que el puente endoperoxido puede abrirse por protonización o complejación por el Fe^{++} . Alternativamente otras hipótesis sugieren que el puente endoperoxido puede abrirse por otras vías y tras tomar agua formar un hidroperóxido insaturado capaz de oxidar ya directamente de modo irreversiblemente a proteínas. Además su degradación da lugar al radical hidroxilo que también puede oxidar residuos aminoácidos de otras proteínas. En todo caso parece que el hierro es esencial para el proceso y que es en la vacuola digestiva donde se encuentra Fe^{++} en mayor proporción por lo que es en este lugar donde se inicia el proceso. La actividad de los radicales formados se ejerce sobre la dimerización de las moléculas de FPP IX bloqueando la formación de hemozoina y sobre otras varias proteínas lo que se ha comprobado experimentalmente entre las que destaca la PfTCTP (proteína tumoral traslacionalmente controlada de *P.falciparum*) que debe jugar un papel fundamental en el ciclo celular y crecimiento, es decir en la esquizogonia, así como sobre las falcipainas, cistin proteasas de la digestión de la globina. La implicación de la vacuola digestiva se demuestra además por las modificaciones observadas tras el tratamiento con artemisinina en dos canales esenciales en la pared de la vacuola, de función divergente, la PfMDR1 (proteína de resistencia múltiple) que ingresa moléculas y la PfCTP (canal de expulsión de cloroquina) que evacua moléculas desde la vacuola al citoplasma. Una actuación múltiple desde la vacuola digestiva que podía ser suficiente para explicar su acción antipalúdica.

Como se mencionó antes, otros apicomplejos como babesias y toxoplasma son sensibles a la artemisinina, sin que sean consumidores de hemoglobina y liberadores de hierro ferroso, por lo que la artemisinina cuenta con otras

dianas: el retículo endoplásmico y la mitocondria. Sobre el retículo inhibe los enzimas responsables de la disposición del calcio encerrándolo en vesículas de depósito en el retículo, transportadoras de Ca^{++} ATPasas, llamadas SERCA (por retículo sarco-endoplásmico). *P. falciparum* tiene sólo un enzima ortólogo de las SERCAs de los vertebrados, es la PfATP6 que curiosamente sólo es inhibida por la artemisinina previamente modificada por hierro ferroso, lo que sugiere que la actividad que paraliza la bomba citoplasmática de **Ca** es posterior a la activación por el hierro y que también el hierro citoplásmico juega este papel. Frente a esta actividad sí que se han comprobado modificaciones moleculares en los enzimas: PfATPasa6 y en la UBU-1 (del sistema ubiquitin-proteosoma, a la que se atribuye función des-ubiquitinizante), así como en la G7 de la pared del apicoplasto a la que se asignan funciones de transporte. Todas éstas tienden a aminorar la acción de la artemisinina en experiencias laborales de inducción de resistencia. También parece que la artemisinina puede disparar una situación de quiescencia que evita su acción sobre el parásito. La última diana descrita es la mitocondria. Parece que la cadena de transporte de electrones activa la artemisinina produciendo un acúmulo de ROS - radicales de oxígeno – que a su vez despolarizan la membrana mitocondrial contribuyendo así activamente a la muerte del parásito.

Profesora Dra. Youyou Tu, breve apunte biográfico (80), (81), (82)

Nace en el distrito de la ciudad de Ningbo, en la provincia centro oriental de Zhejiang el 30 de diciembre de 1930, en el seno de una familia culta. **Tu** es el apellido o nombre familiar y Youyou el propio -relata que se lo puso su padre inspirado en un verso del Libro de las Odas, que dice: “los ciervos balan “youyou” mientras pastan”- y se pregunta si esta onomatopeya sería una alegoría anticipada de su vida dedicada al estudio de las plantas medicinales. Asistió hasta los 18 años al Colegio Xiaoshi donde realizó los estudios iniciales y de primaria superior, además del primer año de enseñanza media, pasando a cursar los siguientes tres años de ésta en el Centro Ningbo de Enseñanza Media. (1948-1951).

A los 21 años ingresó en el Departamento de Farmacia del Colegio Médico/ Escuela Médica de la Universidad de Pekín graduándose en farmacia en 1955. Incorporándose a tareas de investigación en la Academia de Medicina China (ahora llamada Academia China de Ciencias Médicas). Cuatro años más tarde fue seleccionada para realizar durante los siguientes dos y medio años, liberada del trabajo, un curso de Medicina tradicional China, especialmente diseñado para profesionales con formación tipo occidental, completando así su formación. Con estos estudios, a modo de especialidad de postgrado, completó sus conocimientos farmacognósticos al tiempo que entendió la belleza de la concepción holística del hombre en el universo, característica de la cultura milenaria china. Toda su carrera científica se desarrolló en este centro de

investigación y docencia del que es actualmente Investigador jefe. Alcanzó el nombramiento de Investigador (equivalente a Profesor titular o catedrático) en 1980, dos años después del comienzo de la occidentalización económica de la China formalmente comunista, en 1978. En 1981 fue nombrada Consejero académico del doctorado.

El motivo principal de su investigación inicial fue la búsqueda de fármacos contra la esquistosomiosis producida por *Schistosoma japonicum*, zoonosis endémica en gran parte del Este y Sur de China. Estudió los principios activos de *Lobelia chinensis* y su actividad frente a este trematodo. Con posterioridad, al ponerse en marcha el programa 523 de antimaláricos en el que se integró su instituto en Pequín, fue nombrada responsable del equipo dedicado a la evaluación farmacológica y parasitológica experimental de las plantas medicinales y fórmulas usadas en la medicina tradicional china.

Trasladada temporalmente a Yunnan estudió y anotó los métodos tradicionales contra las fiebres intermitentes seguidos por el pueblo, así como los que empleaban los curanderos y médicos rurales de este área endémica. Casada ya con Li Tingzhao, ingeniero metalúrgico y compañero de estudios en el Instituto Xiaoshi, tenía a su primer hija que tuvo que ingresar en un hospicio ya que su marido fue “enviado al campo”, dentro de aquellos programas de la Revolución Cultural que obligaban a los intelectuales urbanitas a integrarse temporalmente en el campesinado del medio rural y sus trabajos de subsistencia.

De vuelta a su Centro en Pekín organiza un grupo multidisciplinario de jóvenes investigadores que recopilan primero todos los datos posibles sobre plantas medicinales y fórmulas elaboradas sobre ellas, así como los métodos seguidos en la medicina tradicional frente a la fiebre en general y las fiebres palúdicas en particular. Un trabajo riguroso que conduce a *Artemisia annua* (*qinghao*, la verde buena). El desarrollo posterior transformó el grupo *qinghao*, que realizó junto con otros a lo largo del país (se citan mas de 600 científicos), el aislamiento, la identificación y las semisíntesis de la artemisinina y sus derivados; dirigiendo además los primeros ensayos de actividad en los modelos experimentales y en la clínica. Aunque también en su país, cuando reconocida por el premio Lasker, se levantaron críticas que trataron de restar importancia a su trabajo, diciendo, que se incorporó al desarrollo de la artemisinina (1969) cuando ya estaba empezado, cuando por la falta de medios, la adversidad política reinante en aquella alocada revolución cultural, destructora de reliquias históricas y de hombre destacados, muchos habían dejado los prometedores trabajos iniciales sobre la actividad de *Artemisia annua*. No importan demasiado estas críticas, lo que sí es cierto es que la Dra. Tu y su grupo hicieron el trabajo correcto. Todos los avances se sustentan en precedentes sólidos y todos son el fruto de una voluntad directora y el esfuerzo de muchos en su apoyo. Dicen sus biógrafos que la Dra. Tu es la

triunfadora de los tres noes: no trabajo o estudió fuera de China, no hizo un postgrado, no lo había en su tiempo, aunque sí una segunda carrera, no pertenecía a ninguna de las Academias de prestigio. Parece que este mal tan típico de nuestro entorno que consiste en minusvalorar lo propio, mientras que se admira, sin más crítica lo de fuera, también lo padece China. Espero que este Nobel, el primero a un científico chino formado en China y el primero a una mujer china, les cure para siempre de este defecto hijo de la envidia.

La Profesora Tu y su marido de toda la vida viven en Pekín donde también reside su segunda hija. La mayor trabaja en la Universidad de Cambridge. Ha sido galardonada con los siguientes premios: 1978, Premio del Congreso Nacional de Ciencia. R. P. China; 1979, Premio nacional de inventores. R. P. China; 1992, Comisión Científica estatal china. Reconocimiento como uno entre los diez notables en Ciencia y Tecnología; 1997, Reconocimiento como uno de los 10 grandes logros en Salud Pública en la Nueva China. R. P. China; Septiembre del 2011, Premio GlaxoSmithKline, al logro sobresaliente en Ciencias de la Vida; Septiembre del 2011, Premio Lasker-DeBaakey de investigación en Medicina Clínica; Noviembre del 2011, Premio a la contribución sobresaliente, Academia China de las Ciencias médicas chinas; Febrero del 2012, Reconocimiento como una de las 10 mujeres más destacadas de la nación R. P. China; Junio del 2015, Premio compartido de la Fundación Warren Alpert. Todo este cúmulo de reconocimientos culminan con el compartido Nobel 2015 de Fisiología o Medicina.

Una vida fructífera, alejada, hasta el despertar ocasionado por la concesión del anticipativo Premio Lasker y el Nobel que ahora celebramos. Un ejemplo de servicio a su país y a la humanidad. Con ella y con el trabajo de William Cecil Campbell y Sitoshi Omura, una vez más, evitamos por un tiempo, lo inevitable y una buena parte del dolor y muerte por los parásitos se ve aminorado o suprimido. Gracias por su trabajo.

REFERENCIAS

1. Nobel Lectures Physiology or Medicine 1922-1941. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1965.
2. <http://www.inesfly.com/index.php>
3. Campbell W C. Parasites and Cancer. *Parasitology Today*. 1997; 15(5): 202.
4. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries and Evaluations. 1994; 61: 121. <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol61/m61-2.html>
5. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Agudelo CA, Hidron A, Eberhard ML, Mathison BA, Frace MA, Ito A, Metcalfe MG, Rollin DC, Visvesvara GS, Jones TL, Greer PV, Vélez Hoyos A, Olson PD, Diazgranados LR, Zaki MD. Malignant Transformation of *Hymenolepis nana* in a Human Host. *N. Engl J Med*. 2015; 373,19: 1845-52.

6. Nombre propuesto, entre otros, por W.C. Campbell. Resume la doble actividad del producto: sobre vermes endoparásitos – la porción *verm* del nombre y sobre ectoparásitos, *ect* y el subfijo *ina*, del latín *ína*, sustancia en el lenguaje químico/farmacológico. La vocal inicial es una licencia. La 22-23 dihidroavermectina se debía llama *hyvermectina* – es decir *hy*, hidro avermectina pero el nombre sonaba a frío, a invierno en francés antiguo, por lo que cambiaron *hy* por *i* latina resultando un nombre de más fácil pronunciación: ivermectin, ivermectina en español.
7. Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 1997; 387, 6632: 489-93.
Los ecdisozos (ecdysozoa) son un grupo (clado) de invertebrados que reúne a todos aquellos que para crecer tienen que mudar ya que poseen esqueleto quitinoso externo, principalmente nematodos y artrópodos.
8. Campbell WC, Ashtom C. Cuckler, in memoriam. *J Parasitol*. 2001; 87(2): 466-467.
9. Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, IL Eary C, Suhayda D, Cifelli S, Riek RF, Campbell, WC. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B15 component. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976; 15: 372-378.
10. Campbell WC. Progress and prospects in the chemotherapy of nematode infections of man and other animals. *J Nematol*. 1983; 15: 608-615.
11. Campbell WC, Fischer MH, Stapley EO, Albers-Schomber G, Jacob CA. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 1983; 221: 823-828.
12. Campbell WC, Burg RW, Fisher MH, Dybas RA. The discovery of ivermectin and other avermectins. In: Magee PS et al. Eds. *Pesticide synthesis through Rational Approaches*. Washington DC: American Chemical Society, 1984; pp 5-20.
13. Campbell WC. Ed. *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer-Verlag, 1989.
14. Campbell WC, Benz GW. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Therap*. 1984; 7, 1-16.
15. Campbell WC. The genesis of the antiparasitic drug, ivermectin. In: Weber RJ, Perkins DN, Eds. *Inventive Minds: Creativity in Technology*. Oxford: Oxford University Press, 1992; pp. 194-214.
16. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong I-L, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Ōmura S. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1979; 15: 361-367.
17. Takahashi Y, Matsumoto A, Seino A, Ueno J, Iwai Y, Omura S. *Streptomyces avermectinus* sp. nov., an avermectin-producing strain. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002; 52 (6): 2163-2168.
18. Crump A. The advent of ivermectin: people, partnerships, and principles. *Parasitology Today*. 2014; 30 (9): 423-425.
19. Kita K, Shiomi K, Ōmura S. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology*. 2007; 23 (5): 223-229.
20. Ōmura S, Crump A. Ivermectin: panacea for resource-poor communities? *Trends in Parasitology*. 2014; 30 (9): 445-455.
21. Molynoux D, Taylor HR. The Discovery of Ivermectin. *Trends in Parasitology*. 2015; 31 (1): 1.
22. Takiguchi Y, Mishima H, Okuda M, et al. Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: Fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Antibiot*. 1980; 33: 1120-1127.
23. Turner MJ, Schaeffer JM. Mode of action of ivermectin. Chapter 5. In: Campbell, W.C. Ed. *Ivermectin and abamectins*. New York: Springer-Verlag, 1989; pp.73-88.
24. Ivermectin fact sheet: www.dar.emory.edu/pi/ivermectin.pdf
25. Stein L, Kircik L, Fowler J, Tan J, Draelos Z, Fleischer A, Appell M, Steinhoff M, Lynde C, Liu H, Jacovella J. Efficacy and safety of ivermectin 1% cream in treatment of papulopustular rosacea: results of two randomized, double-blind, vehicle-controlled pivotal studies. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2014; 13 (3): 316-323.
26. Kobylinski CK, Sylla M, Chapman PL, Sarr MD, Foy BD. Ivermectin Mass Drug Administration to Humans Disrupts Malaria Parasite Transmission in Senegalese Villages. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85: 3-5.
27. Foy BD, Kevin C, Kobylinski KC, Marques da Silva, I. Endectocides for malaria control. *Trends Parasitol*. 2011; 27: 423–428.
28. Hanafi HA, Szumlas DE, Fryauff DJ, El-Hossary SS, Singer GA, Osman SG, Watany N, Furman BD, Hoel DF. Effects of Ivermectin on Blood-Feeding *Phlebotomus papatasi*, and the Promastigote Stage of *Leishmania major*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11(1): 43-52.
29. Pooda SH, Mouline K, De Meeûs T, Bengaly Z, Solano P. Decrease in survival and fecundity of *Glossina palpalis gambiensis* vanderplank 1949 (Diptera: Glossinidae) fed on cattle treated with single doses of ivermectin. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 165.
30. *Ibid* 13. Capítulos 11 y 12.
31. Cherfas J. Ivermectin and faecal degradation. *Parasitology Today*. 1988; 4 (1): 21.
32. Panchal M, Rawat K, Kumar G, Kibria KM, Singh S, Kalamuddin Md, Al Mohammed A, Malhotra P, Tuteja R. Plasmodium falciparum signal recognition particle components and anti-parasitic effect of ivermectin in blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of SRP. *Cell Death Dis*. 5, e994

33. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 2012; 443 (Pt 3): 851–856.
34. Sharmeen S, Skrtic M, Sukhai MA, Hurren R, Gronda M, Wang X, Fonseca SB, Sun H, Wood TE, Ward R, Minden MD, Batey RA, Datti A, Wrana J, Kelley SO, Schimmer AD. The anti-parasitic agent ivermectin induces chloride dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood.* 2010; 116: 3593-3603.
35. Costa JL, Diazgranados JA. 1993. Treatment of human diseases involving dysregulation or dysfunction of the nervous system. US 5189026 A; <http://www.google.com/patents/US5189026>
36. Egerton JR, Brokken ES, Suhayda S, Eary CH, Wooden JV, Kilgore RL. The antiparasitic activity of ivermectin in horses. *Vet Parasitol.* 1981; 8: 83-88.
37. WHO 2010. First WHO Report on Neglected Diseases: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
38. Ibid 13. Capítulo 21. Greene BM, Brown KR, Taylor R. Use of Ivermectin in Humans.
39. Elgart GW, Meinking TL. Ivermectin. *Dermatol Clin.* 2003; 21 (2): 277-82.
40. El orgullo de regalar: la historia de la lucha contra la “ceguera de los ríos”. <http://www.compromisoempresarial.com/entradas/2008/01/el-orgullo-de-regalar-la-historia-de-la-lucha-contra-la-ceguera-del-rio/>.
41. Benin, Burkina Faso, Burundi, Camerún, Chad, Congo, Costa de Marfil, República Democrática del Congo, Etiopía, Guinea Ecuatorial, Ghana, Guinea, Guinea Bissau, Liberia, Malawi, Mali, Nigeria, Senegal, Sierra Leone, Sudan, Sudán del Sur, Togo, Uganda y Tanzania (ibid 38).
42. Halliday A, Gentil K, Hoerauf A, Pearlman E, Taylor MJ, Tamarozzi F. Onchocerciasis: the Role of Wolbachia Bacterial Endosymbionts in Parasite Biology, Disease Pathogenesis, and Treatment. *Clin. Microbiol Rev.* 2011; 24(3): 459-468.
43. OMS/African Program for Onchocerciasis Control: Progress Report 2011 y OMS African Program for Onchocerciasis Control: Meeting of National Task Forces. *Wkly. Epidemiol Rec.* 2011; 48-86: 541-549.
44. OMS (2012) Integrated Preventive Chemotherapy for Neglected Tropical Diseases: Estimation of the Number of Interventions Required and Delivered, 2009–2010, WHO Mectizan Donation Program (2012) Annual Highlights 2011: Celebrating 25 years of the Mectizan Donation Program in 2012: <http://www.mectizan.org/sites/default/files/Annual%20Highlights%202011%20English.pdf>
45. Mectizan Donation Program: <http://www.mectizan.org/news/international-coalition-urges-final-push-to-eliminate-river-blindness-from-the-americas>.
46. OMS, 2014. Prevention, control and elimination of onchocerciasis. <http://www.who.int/onchocerciasis/control/en/>
47. Lustigman S, McCarter J. Ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*: Toward a genetic basis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007; 1 (1): e76.
48. Boussinesq M, Kamgno J, Pion SD, Gardon J. What are the mechanisms associated with post-ivermectin serious adverse events? *Trends in Parasitology.* 2006; 22 (6): 244-246.
49. Campbell, W.C. Ed. *Trichinella and Trichinosis*. New York: Springer-Verlag, 1983.
50. Brown D, Matzuk AR, Ilves IR, Peterson LH, Harris SA, Sarett LH, Egerton JR, Yakstis JJ, Campbell WC, Cuckler J AC. Antiparasitic Drugs. Iv. 2-(4'-Thiazolyl)-Benzimidazole, A New Anthelmintic. *Am Chem Soc.* 1961; 83 (7): 1764-5.
51. Martínez Fernández, A.R. Investigaciones sobre la eficacia de la methiridina y del thiabendazol frente a *Trichinella spiralis* (Owen 1835) Railliet, 1895. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. An Fac Vet León. 1966; 11: 127-216.
52. Campbell, W.C. Poem, Paint and Pathogen. *Prospectives in Biology and Medicine.* 1989; 32: 3.
53. Satoshi Ōmura/Curriculum vitae/2014: http://www.satoshi-omura.info/biography/omura_cv.pdf.
54. Ōmura S. Microbial metabolites: 45 years of wandering, wondering and discovering. *Tetrahedron.* 2011; 67: 6420-e6459.
55. Kita K, Shiomi K, Omura S. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology.* 2007; 23 (5): 223-9.
56. OMS, http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/
57. Watt G, Loesuttivibool L, Shanks GD, Boudreau EF, Brown AE, Pavanand K, Webster HK, Wechgritaya S. Quinine with tetracycline for the treatment of drug-resistant falciparum malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47 (1): 108-11.
58. Schlitzer M. Malaria chemotherapeutics Part I. History of antimalarial drugs development, currently used therapeutics, and drug in clinical development. *Chem Med Chem.* 2007; 2: 944-86.
59. Raviña E. Medicamentos. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de los fármacos. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela, 2008; vol. I, pp. 255-219
60. Meshnick SR, Dobson MJ. The history of antimalarial drugs. In: Rosenthal PJ. Ed. *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*. Totowa: Humana Press Inc.; pp. 1-25.
61. Ognibene AJ, Conte, NF. History of the Office of Medical History. Chapt 14. Malaria Chemotherapy. US Army Medical Department: 1960-65.

62. Beadle C, Hoffman SL. History of malaria in the United States Naval Forces at war: World War I through the Vietnam conflict. Clin Infect Dis. 1993; 16 (2): 320-9.
NOTA: Las bajas en la Marina USA fueron creciendo en las sucesivas guerras del siglo XX, durante la 1ª Guerra mundial hubo 4.746 nuevos casos con 68.373 días de baja y siete fallecimientos; Durante la 2ª los casos se elevaron a 113.256 con 3.310.800 días de baja por enfermedad con 90 fallecimientos. En la guerra de Corea los nuevos casos bajaron a 4.542 con 50.924 días de baja, lo que se explica por la menor duración del conflicto (1950-53) y la presencia sólo de P.vivax.
63. Srinivas. Malaria in Wars and Victims. February 25, 2015. History: <http://www.malariasite.com/tag/vietnam-war/>
64. Knight DJ, Peters W. The antimalarial activity of N-benzyloxydihydrotriazines. I. The activity of clociguanil (BRL 50216) against rodent malaria, and studies on its mode of action. Ann Trop Med Parasitol. 1980; 74 (4): 393-404.
65. Croft AM. A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. J R Soc Med. 2007; 100: 170-4.
66. Cui L, Su X-z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of malaria. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 7 (8): 999-1013.
67. <http://themaskeclady.blogspot.com.es/2010/12/artemisia-ii-y-el-mausoleo-de.html>
68. Julián o Juliano, Maestro Pedro (Petrus Hispanus o Papa Juan XXI): Thesaurus Pauperum... Lugduni: Antonio Blachard, 1530. Thesoro de los pobres. Comiença vn libro muy provechoso para toda persona: llamado Thesoro de pobres en romance... El qual mandó hazer el papa Juan a vn medico suyo llamado maestre Juliano, Toledo, s.i., s.a. y Burgos, 1524; Madrid, 1644; Sevilla, 1655. Y 1727- Cita tomada de Actas IV (1996). Lina Rodríguez Cacho. Tesoros de frailes y tesoros laicos: cvc.cervantes.es/literatura/aiso/pdf/04/aiso_4_2_052.pdf
69. OMS, TDR/CHEMAL/ART/86.3. The development of artemisinin and its derivatives. Report of the meeting of the scientific working group on artemisinin.: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/61147?locale=es>
70. Laguna A. Pedacio Dioscorides anazarbeo. Acerca de la materia medicinal... traducido, ilustrado y anotado por el Dr. Andrés Laguna. Edición 1570 por Matias Graft, Salamanca.
71. Tu YY. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. Nature Medicine. 2011; 17 (10): 1216-20.
72. Collaboration Research Group for Qinghaosu. A new sesquiterpene lactone—qinghaosu [in Chinese]. Kexue Tongbao 1977,3, 142; Gu, Y.C. & Tu, Y.Y. Studies on chemical constituents of Artemisia japonica Thunb [in Chinese]. Chin Tradit Herbal Drugs. 1993; 24: 122–4. Ambos trabajos en lengua china citados por Tu, YouYou⁷¹.
73. Muchas de las especies de Artemisia: *A.vulgaris*, *A. absinthium*, *A.herba-alba*, tienen actividad antihelmíntica. La especie más utilizada a este fin fue *A. cina*, las cabezuelas florales amarillas cosechadas justamente antes de la floración era lo conocido como *semen-contra vermis*. De la planta *A. marítima* var *stechmanniana*, sinónimo de : *A. cina*, *A. chamaemelifolia*; se empleaba la droga santónico y se extraía el fármaco santonina, una lactona químicamente definida. La santonina fue utilizada hasta la llegada hacia la mitad del siglo XX de la fenotiacina y la sucesión de antihelmínticos de síntesis: piperazina, tiabendazol, carbamatos de bencimidazol.
74. O'Neill P, Barton V E, Ward SA. The molecular Mechanism of action of Artemisinin. The debate continues. Molecules. 2010; 15: 1705-21.
75. Ding XC, Beck, H-P, Raso G. Plasmodium sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. Trends in Parasitology. 2011; 27 (2): 73-81.
76. Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WSF. Artemisinins: Pharmacological action beyond anti-malaria. Pharmacology & Therapeutics. 2014; 142: 126-39.
77. Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li,Y, Zhou B. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation, PLoS ONE. 2010; 25 (3), e982: 1-12.
78. Crespo MP, Avery TD, Hanssen E, Fox E, Robinson TV, Valente P, Taylor DK, Tilley L. Artemisinin and series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (1): 98-109.
79. Hastings I. How artemisinin-containing combinations therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. Trends in Parasitology. 2011; 27 (2): 67-72.
80. https://en.wikipedia.org/wiki/Tu_Youyou
81. <http://www.edubilla.com/inventor/tu-youyou/>
82. Ortiz Melón JM. El premio Lasker, la medicina tradicional china y el descubrimiento de la artemisina. An R Acad Nac de Farmacia. 2011; 77 (4): 13-6.

El Premio Nobel 2015 en Química. Reparación del daño genético: retorno a los primeros tiempos de la genética en la era genómica

Juan-Ramón Lacadena Calero

La Genética se puede definir como la “ciencia que estudia el material hereditario –los genes– bajo cualquier nivel o dimensión” (1, 2). En otras palabras, el contenido formal de la Genética trata de responder a cinco preguntas fundamentales respecto a los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo? (3).

El ADN, como material hereditario, tiene tres propiedades genéticas esenciales: es capaz de conservarse a sí mismo (*replicación*), es susceptible de cambiar (*mutación*) y es portador de información (*código genético*). Cualquier molécula química que constituyera el material hereditario en otro planeta de esta u otra galaxia tendría que tener forzosamente estas mismas tres propiedades. En efecto, el mecanismo de replicación del ADN asegura la conservación idéntica de la información genética de manera que al producirse la división celular en los organismos pluricelulares las células hijas conservan la misma información y el desarrollo no se convierte en un caos genético que haría inviable al organismo. No obstante, el proceso molecular de la replicación puede tener algún error. Por otro lado, la mutación es una propiedad genética esencial porque si no hubiera variabilidad genética no se podría haber producido el fenómeno de la evolución biológica, en cuyo caso no estaríamos nosotros aquí y ahora celebrando esta sesión científica. Esto quiere decir que el ADN es una molécula química inestable y que la existencia de cambios o mutaciones en el ADN es bueno para que la selección actúe en el proceso evolutivo. Sin embargo, sí sería muy perjudicial para la vida de los organismos que la frecuencia de cambios en la secuencia de bases del ADN fuera excesivamente elevada; de ahí la importancia de que en las células existan mecanismos que corrijan los daños genéticos producidos en el ADN ya sea por la propia inestabilidad química de la molécula en el ambiente celular normal ya sea por acción de agentes externos de naturaleza física (por ejemplo, los rayos X y rayos UV) o de naturaleza química (agentes alquilantes, pesticidas, derivados industriales, aditivos de la alimentación, etc.).

Puesto que estamos celebrando esta sesión científica en ocasión de la concesión del premio Nobel 2015 en Química en un tema que atañe al material hereditario (el ADN), me parece oportuno señalar que antes de ahora numerosas investigaciones en torno a las tres propiedades genéticas esenciales del ADN antes mencionadas han sido motivo de concesión de varios premios Nobel, tal como se indica a continuación (4):

- Replicación del ADN

Replicación semiconservativa: propuesta por Watson y

Crick (1962).

Síntesis enzimática del ADN: A. Kornberg (1959).

- Mutación

Inducción de mutaciones con rayos X: Muller (1946).

Mutagénesis dirigida: Smith (1993).

Elementos genéticos móviles: McClintock (1983).

- El ADN como portador de información: cómo y cuándo se expresan los genes

Hipótesis un gen-una enzima: Beadle y Tatum (1958).

Hipótesis de la secuencia: Crick (1962).

Desciframiento de la clave del código genético: Ochoa (1959), Nirenberg y Khorana (1968).

El ARN mensajero: Jacob (1965) y Brenner (2002).

Análisis molecular de la transcripción en eucariontes: R.D. Kornberg (2006).

Análisis molecular de la traducción: estructura molecular y función del ribosoma: Ramakrishnan, Steitz y Yonath (2009).

El ARN transferente: Holley (1968).

Genes discontinuos: Sharp y Roberts (1993).

Procesamiento y actividad catalítica del ARN: Altman y Cech (1989).

Regulación de la expresión génica. Modelo del operón: Jacob y Monod (1965).

Regulación de la expresión génica mediante interferencia del ARN: Fire y Mello (2006).

Control genético del desarrollo embrionario temprano en *Drosophila*: Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995).

Control genético de la organogénesis y de la muerte celular programada en *Caenorhabditis elegans*: Brenner, Horvitz y Sulston (2002).

Utilización de los ratones knockout (tecnología knockout) en estudios de genética del desarrollo: Capecchi, Evans y Smithies (2007).

Utilización del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) para detectar la expresión de los genes: Chalfie (2008).

Reprogramación celular. transferencia nuclear e inducción de células troncales pluripotentes: Gurdon y Yamanaka (2012).

La importancia del estudio de los mecanismos de reparación del daño genético ha llevado a la Real Academia de Ciencias de Suecia, con sede en Estocolmo, a otorgar el 7 de octubre pasado el Premio Nobel en Química 2015 a los doctores Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar por sus “estudios sobre los mecanismos de reparación del ADN”. Casi me atrevería a decir que se trata de un retorno a los primeros tiempos de

la Genética en la era de la Genómica porque, ciertamente, las investigaciones sobre la mutación en la historia de la Genética puede decirse que se iniciaron hace casi noventa años cuando Muller, en 1927, demostró que los rayos X producían mutaciones (5), aunque en aquella época ni siquiera se conocía la base molecular de la herencia; es decir, no se sabía que los genes son ADN. En 1946, Muller recibió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”.

Siguiendo el informe hecho público por la Real Academia Sueca de Ciencias (6) se puede resumir que, “Lindahl demostró que el ADN es una molécula inherentemente inestable sujeta a degradación incluso bajo condiciones fisiológicas, identificando después un grupo totalmente nuevo de ADN glicosidasas y describiendo su papel en la *reparación por escisión de bases*. Por su parte, Sancar transformó el campo de la *reparación por escisión de nucleótidos* desde la genética y los fenómenos en extractos celulares a una detallada descripción molecular de los mecanismos implicados en bacterias y en células eucarióticas. Además, Sancar también explicó los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso de la *fotorreactivación*, que fue la primera forma descrita de reparación del ADN. Finalmente, Modrich transformó el campo de la *reparación del apareamiento erróneo* (*mismatch repair*) desde las observaciones genéticas a una detallada comprensión bioquímica, primero en bacterias y más tarde en células eucarióticas.

Pasamos pues a comentar brevemente los cuatro mecanismos de reparación implicados en la concesión del Premio Nobel en Química 2015: fotorreactivación, reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos y reparación del apareamiento erróneo.

1. Fotorreactivación

Aunque desde hacía muchos años antes se sabía que la luz ultravioleta (UV) inducía mutaciones y afectaba a la viabilidad de las células, no fue hasta 1949 cuando Kelner demostró que la luz visible podía estimular el crecimiento de las células bacterianas que había sido detenido tras la exposición a la luz UV (7). El fenómeno, que fue denominado *fotorreactivación*, suponía la existencia de algún mecanismo celular dependiente de la luz visible que podía corregir el daño celular ocasionado por la luz UV. Más tarde, en los años 1958 y 1960, Rupert demostró la existencia de una actividad enzimática -denominada *fotoliasa*- que estaba presente en extractos acelulares de *Sacharomyces cerevisiae* y de *Escherichia coli* (8). Dieciocho más tarde, en 1978, el galardonado Aziz Sancar, haciendo la tesis doctoral bajo la dirección de Rupert, logró clonar el gen de la fotoliasa de *Escherichia coli*, amplificando el producto génico *in vivo* (9). Tras unos años de interrupción, Sancar retomó la investigación sobre la fotoliasa y su mecanismo de reacción, demostrando en 1987 que la enzima puede convertir la energía de un fotón absorbido en energía química que produce un radical libre localizado que inicia la rotura del dímero de timina

inducido por la luz UV. El mecanismo de fotorreactivación no existe en células de mamífero que, sin embargo, disponen de un mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (*reparación oscura* que será descrito en otro apartado) que corrige el daño producido por la radiación UV.

2. Reparación por escisión de bases

En la década de los setenta del siglo pasado, Tomas Lindahl (10) demostró que, aún en condiciones fisiológicas normales, el ADN está sometido a una serie de reacciones químicas tales como la desaminación, la oxidación y la metilación no enzimática que degradan el ADN (*ADN decay*) modificando las bases nitrogenadas y dando lugar a mutaciones. Lindahl demostró que ocurre con elevada frecuencia la desaminación de la citosina, transformándose en uracilo que, al ser capaz de aparearse con la adenina, da lugar tras la replicación del ADN a la sustitución de pares de bases citosina-guanina por adenina-timina en las cadenas complementarias (11).

Ante la frecuencia con que ocurre este proceso en condiciones fisiológicas normales, Lindahl pensó que tenían que existir mecanismos enzimáticos que corrigieran los posibles errores, demostrando la existencia en *Escherichia coli* de una uracil-ADN glicosidasa que resultó ser la primera proteína de reparación del ADN conocida (12). Puede decirse que esta enzima fue el miembro fundador de una gran familia de proteínas que actúan en el proceso conocido como *reparación por escisión de bases* (*BER*). Lindahl demostró también que el armazón estructural del ADN permanecía intacto durante el proceso de reparación lo cual implicaba la existencia de otra clase de enzimas: las apurin/apirimidin nucleasas. Finalmente, varios años más tarde, Lindahl pudo reconstituir el proceso BER, tanto en *Escherichia coli* (13) como en células humanas (14).

3. Reparación por escisión de nucleótidos

La radiación UV produce la dimerización de dos pirimidinas consecutivas en la misma cadena del ADN. De las tres combinaciones posibles C-C, C-T y T-T, la dimerización de las timinas (T-T) es la más frecuente. Esta anomalía estructural del ADN afecta a los procesos normales de replicación y de transcripción, dando lugar a mutaciones deletéreas (15).

Además del mecanismo de fotorreactivación antes descrito, se demostró que había otros mecanismos de reparación del ADN que eran independientes de la luz visible, denominándose *reparación oscura*. En 1964, Setlow y Carrier demostraron que los dímeros de timina originados por la luz UV desaparecían poco después de las grandes moléculas de ADN, apareciendo, en cambio, en fracciones de ADN de bajo peso molecular, lo cual les permitió postular que los dímeros de timina habían sido escindidos de la molécula original de ADN gracias a un mecanismo de escisión (16). De ahí el nombre de *reparación por escisión de nucleótidos* (*NER*).

La investigación de las enzimas implicadas en la NER

empezó por la identificación en 1966 de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC* cuyas mutaciones impedían la reparación del daño genético producido por la radiación UV (17). La identificación de las correspondientes proteínas fue posible gracias a la técnica “maxicell” puesta a punto en 1979 por el galardonado Aziz Sancar (18). Posteriormente, en 1983, Sancar utilizó las proteínas purificadas UvrA, UvrB y UvrC para describir las fases esenciales de la NER (19): las proteínas hidrolizan dos enlaces fosfodiéster en la hélice dañada del ADN. Las incisiones se producen en lugares precisos: una, en el octavo enlace fosfodiéster en el extremo 5' y, otra, en el cuarto o quinto enlace fosfodiéster en el extremo 3', dando lugar a un fragmento escindido de unos 12 o 13 nucleótidos. Posteriormente, el segmento escindido es reemplazado por una nueva síntesis de ADN: es el mecanismo denominado *cortar y parchear*.

Las células de mamíferos tienen también un sistema de cortar y parchear análogo al de las bacterias con la diferencia de que intervienen en el proceso más de quince proteínas en lugar de las tres del sistema bacteriano.

4. Reparación del apareamiento erróneo (*mismatch repair*)

Decíamos antes que la replicación del ADN debe conservar con exactitud la secuencia de bases en las moléculas hijas. Por ello la propia ADN polimerasa tiene, además de la función polimerizante 5'→3', una función exonucleasa 3'→5' -llamada función “correctora de pruebas”-descrita en 1972 por Arthur Kornberg (20) (premio Nobel 1959 en Fisiología o Medicina junto a Severo Ochoa “por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica de los ácidos ribonucleico y desorribonucleico”) que repara cualquier apareamiento erróneo (*mismatch repair*) que pueda producirse durante la replicación al incorporar alguna base nitrogenada no complementaria (recordemos la complementariedad adenina-timina y guanina-citosina). Sin embargo, se ha estimado que, a pesar de la función “correctora de pruebas”, los errores de apareamiento durante la replicación ocurren con una frecuencia de 5×10^{-5} por cada par de bases. Gracias a la existencia de otros mecanismos de reparación se ha estimado que, por ejemplo en células germinales humanas, la tasa de mutación por cada par de bases nitrogenadas desciende hasta un 1×10^{-8} . Como señala el informe de la academia sueca, el doctor Paul Modrich “transformó el campo de la reparación del apareamiento equivocado (*mismatch repair*) desde las observaciones genéticas a una comprensión bioquímica detallada, primero en bacterias y más tarde en células eucarióticas”.

La historia genética de la “reparación del apareamiento erróneo (*mismatch*)” se remonta a los años cincuenta cuando Lindegren (21) observó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que la segregación meiótica de un núcleo *Aa* no segregaba en la proporción 2A:2a sino en la proporción 3A:1a, dándole el nombre de *conversión génica* que había sido propuesto por Winkler en 1930 para explicar el cambio de un estatus alélico a otro en el

heterocigoto *Aa*; es decir, *A* se transforma en *a* o bien *a* se transforma en *A* (22), contraviniendo el *principio mendeliano de segregación* (2ª ley de Mendel) que dice que “los miembros de una pareja alélica se separan (segregan) uno de otro sin sufrir modificación alguna cuando un individuo heterocigoto (*Aa*) forma las células germinales o gametos”. Posteriormente el fenómeno de la conversión génica se relacionó con el proceso molecular de la recombinación, concluyendo finalmente en el modelo propuesto en 1964 por Holliday (23) que incluye la formación de “ADN híbrido” o heterodúplex (apareamiento erróneo, *mismatch*) que puede ser corregido enzimáticamente. Para mí, como profesor universitario, me llena de satisfacción comprobar que en mis libros de texto escritos hace ya muchos años se trataban con profundidad estos temas que la concesión del Premio Nobel 2015 en Química ha traído a la actualidad (24, 25).

Investigaciones previas llevadas a cabo por diversos autores habían puesto en evidencia en la década de los setenta del siglo pasado que

- la reparación de dos o más apareamientos incorrectos de bases en el heterodúplex se producen normalmente en la misma cadena de la doble hélice, permitiendo así la reparación de tramos largos del ADN (26);
- la maquinaria de reparación era guiada de alguna manera a la nueva hélice sintetizada por la propia maquinaria replicativa o bien por la no metilación durante un cierto tiempo de la nueva hélice en determinadas sedes (metilación de la adenina en la secuencia GATC) (27);
- la pérdida de la metilasa de ADN aumenta la frecuencia de mutación en *Escherichia coli* (28);
- se identificaron los genes (*mutH*, *mutL*, *mutS*, y *uvrD*) necesarios para que se realice la corrección del apareamiento de bases incorrecto dependiente de la metilación del ADN (29).

Con estos antecedentes, Paul Modrich presentó en 1983 la evidencia directa del mecanismo de reparación dirigido por la metilación del ADN, demostrando que la actividad reparadora depende del ATP y del estado de metilación del heterodúplex y que la mutaciones de los genes *mutH*, *mutL*, *mutS* y *uvrD* impiden la reparación del apareamiento de bases incorrecto en extractos acelulares de *Escherichia coli*. Posteriormente, aisló los productos de los genes implicados en la reparación, identificando las proteínas correspondientes y analizando sus propiedades en un sistema *in vitro*. Finalmente, en 1989 publicó un trabajo fundamental en el que explica el funcionamiento del sistema de reparación en un sistema *in vitro* (30). En primer lugar demostró el requerimiento de las enzimas ADNpol III, exonucleasa I y ADN ligasa, combinándolas con las proteínas MutH, MutL, MutS, UvrD y una proteína de unión al ADN monocatenario. Todos estos factores juntos pueden procesar *in vivo* los errores de apareamiento de bases actuando sobre la hélice adecuada de ADN dirigidos por la secuencia GATC hemimetilada (sólo está metilada la adenina de la hélice molde) que está localizada a cierta distancia del apareamiento erróneo. El papel de las

distintas proteínas es el siguiente: MutS reconoce y se une al par de bases no complementarias; MutH confiere la especificidad de la hélice de ADN uniéndose a la sede hemimetilada GATC de la hélice naciente. MutL actúa como mediador interactuando con MutH y MutS, transduciendo señales desde MutS que originan la activación de la actividad endonucleasa de MutH produciendo una rotura en la hélice naciente de ADN cerca del la sede GATC hemimetilada. A continuación la helicasa UvrD separa las dos hélices de ADN hacia el lugar donde está el apareamiento erróneo, deteniéndose una vez pasado el par de bases equivocado. La hélice sintetizada es reemplazada mediante una reacción de relleno del hueco en la que la ADNpol III usa la hélice parental como molde.

Posteriormente, Modrich demostró que el sistema de reparación también funciona en células eucarióticas y humanas aunque con ciertas variaciones.

Reparación del ADN y cáncer

Un comportamiento defectuoso de los sistemas de reparación del daño genético (reparación por escisión de bases o de nucleótidos o de apareamiento erróneo de bases u otros) cambia la información genética de las células y puede aumentar el riesgo de cáncer. Es bien conocido el caso de la enfermedad humana conocida como *xeroderma pigmentosum* que produce alteraciones en la pigmentación de la piel debido a un fallo en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos; pues bien, las personas con esta enfermedad son extraordinariamente sensibles a la radiación ultravioleta y pueden desarrollar cánceres de piel con una alta probabilidad. También se ha demostrado que la actuación defectuosa del sistema de reparación del apareamiento incorrecto de bases aumenta el riesgo del cáncer de colon y puede ser hereditario. Por otro lado, dado que las células cancerosas tienen su ADN más inestable se está tratando de atacarlas disminuyendo su capacidad de reparar el ADN mediante fármacos que inhiben los sistemas de reparación como es el caso del medicamento *olaparib*.

Epílogo

Como ha ocurrido en ocasiones anteriores, es el momento de mostrar mi satisfacción como profesor universitario de Genética porque, una vez más, investigaciones del campo de la Genética han sido galardonadas con el premio Nobel, máximo reconocimiento de la comunidad científica. En efecto, teniendo en cuenta que la institución de los premios Nobel en 1901 coincide prácticamente con el nacimiento de la Genética con el redescubrimiento de la leyes de Mendel en 1900, es perfectamente posible seguir la historia de la Genética como un historia “nobelada” (con “b” de Nobel), que fue precisamente el título de mi discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia en 1995 (31).

En efecto hoy, en 2015, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 42 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 93 científicos del

campo de la Genética o ciencias afines. De los 42 premios considerados, 32 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 9 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 93 científicos galardonados, 71 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 21 de Química y 1 de la Paz. Finalmente, me gustaría destacar que en los quince años que va de siglo XXI se ha premiado la investigación genética en catorce ocasiones: en 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”), 2004 (Axel y Buck, “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”), 2006 (Fire y Mello, “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”), 2006 (Kornberg, “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”), 2008 (zur Hausen, “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”; Barré-Sinoussi y Montagnier, “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, “por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”), 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, “por los estudios de la estructura y función del ribosoma”), 2011 (Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann “por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata”; y a Ralph M. Steinman “por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa”), 2012 a John B. Gurdon y Shinya Yamanaka “por el descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes”, 2013 a Randy W. Schekman que compartió el premio con James E. Rothman y Thomas C. Südhof “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema principal de transporte en nuestras células” y, finalmente, en 2015 a Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar “por sus estudios de los mecanismos de reparación del ADN”.

Finalmente, para terminar y en este contexto en relación con las investigaciones sobre los mecanismos de reparación del ADN premiadas el presente año, no resisto la tentación de profetizar para un próximo futuro el galardón Nobel para las investigadoras Jennifer Doudna y Emmanuel Charpentier (ambas han sido galardonadas con el Premio Princesa de Asturias 2015) que patentaron en 2012 la técnica denominada CRISPR-Cas9 (CRISPR por *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Cas, por *CRISPR-associated*) que está revolucionando la biotecnología por su aplicación a la “edición genómica” (*genome editing*), entendiendo por “edición genómica” la

modificación o eliminación de secuencias precisas del ADN para corregir una mutación causante de una enfermedad. Esta técnica, conocida coloquialmente como “*corta y pega*”, se podría considerar en cierto modo como una versión nueva y sofisticada de un mecanismo de “*cortar y parchear*” de alguno de los procesos de reparación del ADN anteriormente descritos. Las aplicaciones en investigación básica y en su utilización clínica pueden ser fantásticas. Pero no podemos olvidar aquello de que “a nuevos avances técnicos, nuevos retos éticos” porque, de hecho, ya se han producido situaciones no deseadas como, por ejemplo, la modificación genómica de embriones humanos.

Para hacer una glosa más detallada de las investigaciones galardonadas con el Premio Nobel 2015 en Química, cedo la palabra al Prof. Dr. Manuel R. Benito de la Heras, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y Académico Correspondiente de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

REFERENCIAS

1. Rubio J. Genética. Su posición entre las ciencias biológicas. Boletín Est Exp Aula Dei. 1973; 12: 80 pp.
2. Lacadena JR. Introducción a la Genética: Una perspectiva histórica. Ser Monograf Dpto Genética, Fac. Biología. Madrid: Universidad Complutense, 1974; vol.1, 39 pp.
3. Lacadena JR. Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia (leído el 14 de diciembre de 1995); Madrid 1995.
4. Lacadena JR. Conmemorando los 100 años del término “Genética” (1905-2005): Una historia “nobelada” de la Genética. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones 2007.
5. Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. Science 1927; 66:84-7.
6. Gustafsson CM. Mechanistic studies of DNA repair. The Royal Swedish Academy of Sciences 2015.
7. Kelner A. Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia Coli*, with Special reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. J Bacteriol 1949; 58:511-22.
8. Rupert CS. Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers` yeast. J Gen Physiol 1960; 43:573-95.
9. Sancar A, Rupert CS. Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. Gene 1978; 4:295-308.
10. Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 1972; 11:3610-8.
11. Lindahl T, Nyberg, B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. Biochemistry 1974; 13:3405-10.
12. Lindahl, T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. Proc Nat Acad Sci 1974; 71:3649-53.
13. Dianov G, Lindahl T. Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. Curr.Biol 1994; 4:1069-76.
14. Kubota Y. et al. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J 1996; 15:6662-70.
15. Setlow RB, Setlow JK. Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. Proc Nat Acad Sci 1962; 48:1250-7.
16. Setlow RB, Carrier WL. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. Proc Nat Acad Sci. 1964; 51:226-31.
17. Howard-Flanders P, Boyce RP, Theriot L. Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. Genetics 1966; 53:1119-36.
18. Sancar A, Hackl AM, Rupp WD. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. J Bacteriol 1979; 137:692-3.
19. Sancar A, Rupp WD. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both side of the damaged region. Cell 1983; 33:249-260.
20. Brutlag D, Kornberg A. 1972. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. J Biol Chem 1972; 247:241-8.
21. Lindegren CC. 1953 Gene conversion in *Saccharomyces*. J Genet 1953; 51:625-637.
22. Winkler, H. Die Konversion der Gene. Jena: Gustav Fischer 1930.
23. Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet Res 1964; 5:282-304.
24. Lacadena JR. Genética (Capítulo VI). 3ª edición. Madrid: A.G.E.S.A. 1981. 25. Lacadena, J.R. Citogenética (cap. 9). Madrid: Universidad Complutense 1996.
26. Wagner R. Jr, Meselson M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. Proc Nat Acad Sci 1976; 73:4135-9.
27. Marinus MG. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1976; 128:853-4.
28. Marinus MG, Morris NR. Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation on mutation (dam-3) in *Escherichia coli* K12. Mutation Res 1975; 28:15-26.
29. Glickman BW, Radman M. *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch corrections. Proc Nat Acad Sci 1980; 77:1063-7.

30. Laue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. Science 1989; 245:160-4.
31. Lacadena JR. (Ver nota 3).

Premio Nobel 2015 de Química. Genes reparadores del ADN

Manuel R. Benito de las Heras

Corresponding Author: benito@farm.ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 386-397

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer o desarrollo tumoral se caracteriza por un crecimiento excesivo y descontrolado de un grupo de células que invaden y dañan tejidos y órganos. Es una de las causas mas frecuentes de mortalidad ocupando un segundo puesto en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares o coronarias. La incidencia del cáncer ha aumentado en las últimas décadas; si bien es notorio que en aquellos países donde el control sanitario es mayor ha habido una disminución de los casos de mortalidad, en los últimos años, debido a los grandes avances en los tratamientos terapéuticos y en el diagnóstico precoz. El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células formando un tumor o neoplasia y la posterior adquisición por parte de estas células de capacidad invasiva permitiéndoles migrar desde su lugar de origen a otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Para entender o estudiar la carcinogénesis hay que tener en cuenta su alta complejidad, la cual que se refleja en la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores y el gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas. Estas seguirán aumentando conforme se avance en el conocimiento de nuevas moléculas o nuevas funciones de moléculas ya conocidas, cuya activación o inactivación puedan afectar a los procesos de proliferación y diferenciación celular, ya sea a nivel del ciclo celular, a nivel de apoptosis etc.

El cáncer se considera una enfermedad genética esporádica, excepcionalmente hereditaria. El proceso de formación de un tumor consiste en la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células que forman dicho tumor. Existen dos posibles conjuntos de alteraciones genéticas: cambios en la secuencia del ADN y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de genes. Las alteraciones a nivel de secuencia pueden ser deleciones de regiones cromosómicas, que implican pérdida de genes que pueden estar relacionados con la regulación negativa del ciclo celular, como es el caso de los genes supresores de tumores; mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas; amplificaciones génicas que conllevan la sobreexpresión de genes específicos; e incluso, pérdidas y ganancias de cromosomas enteros. En cuanto a alteraciones epigenéticas nos encontramos con el silenciamiento de genes causado por hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como es caso de p16INK4a, el gen MLH1 o el gen BRCA1. Cuando estas alteraciones se encuentran en las células de la línea germinal se transmiten a la

descendencia. Este es el caso del cáncer de mama, patología en la que aproximadamente un 5-10% de los afectados son consecuencia de la herencia por vía germinal de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. También en este grupo encontramos alteraciones genéticas que transmiten una predisposición a desarrollar un tipo o varios tipos de tumores, como es el caso de la ataxia telangiectasia, cuya mutación afecta al gen ATM que esta implicado en los procesos de reparación del ADN, y sus pacientes desarrollan linfomas de tipo no Hodgkin, leucemias linfocíticas agudas, carcinoma de estómago y, además, poseen una alta predisposición para el cáncer de mama. Estas alteraciones genéticas en el cáncer hereditario pueden afectar a genes supresores y a genes de reparación del ADN. Ejemplos de mutaciones en genes reparadores del ADN aparecen en algunos casos como el cáncer colorrectal hereditario de tipo no polipósico (HNPCC) con mutaciones fundamentalmente en los genes MSH2 y MLH1. En cuanto a mutaciones en genes supresores de tumores, encontramos un tipo de cáncer muy conocido como es el retinoblastoma, donde el gen alterado es el gen supresor de tumores Rb; la poliposis familiar adenomatosa, donde el gen afectado es APC; el tumor de Wilms, con el gen Wt1 mutado; las neurofibromatosis de tipo 1 y 2 con alteraciones en los genes NF1 y NF2.

Las causas del cáncer residen en: a) fallos endógenos en procesos celulares y b) agentes externos que pueden alterar nuestros genes. Estos agentes externos se pueden dividir en tres grupos: agentes químicos, algunos naturales, pero la mayoría producidos por la actividad industrial que causan entre un 80-90% de los casos; agentes físicos como radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y fibras minerales (asbestos) que constituyen el 5% de los casos; y los virus responsables de un 5-10% de los cánceres (tales como HPV-16, HPV-18 y otros).

Hay muy pocos casos de tumores que posean alteraciones constantes, solamente en algunos procesos linfoproliferativos y algunas leucemias que tienen translocaciones características, como es el caso de los linfomas foliculares con la translocación t(14,18), linfomas del manto t(11;14), leucemia mieloide crónica t(9;22) etc. Entre los mecanismos implicados en la carcinogénesis humana, dos de ellos serán objeto de atención en este capítulo, a saber:

- 1) Mecanismos de reparación del ADN y sus alteraciones en cáncer.
- 2) Integridad de los extremos teloméricos y su implicación en cáncer.

2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN Y CÁNCER

2.1. Mecanismos de reparación del ADN

El ADN genómico de todos los organismos está constantemente sometido a la acción de agentes exógenos y endógenos que provocan modificaciones en el mismo. Además, algunas vías del metabolismo del ADN, como es el proceso de replicación, también provocan alteraciones en su estructura debido a la introducción de errores durante la síntesis de las nuevas cadenas. Por otro lado, resulta esencial el mantenimiento de la integridad del genoma, con objeto de que éste se transmita sin alteraciones entre las distintas generaciones. Por ello, las células superiores disponen de distintos sistemas de reparación, cuya actuación está encaminada básicamente al mantenimiento de la integridad del ADN. Entre estos sistemas de

reparación cabe citar los siguientes: mecanismos de reparación por escisión de bases (Base Escisión Repair o BER), mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Escision Repair o NER), mecanismos de reparación de errores de replicación (Mismatch Repair System o MMR), y mecanismos de reparación por recombinación homóloga.

2.2. Sistema MMR y Cáncer

El correcto funcionamiento del sistema de reparación de errores de replicación, o de apareamientos incorrectos, es crítico para el mantenimiento de la integridad del genoma. En mamíferos las proteínas del sistema MMR mejor conocidas son las que se citan en la Tabla 1.

Tabla 1. Proteínas “MMR” en mamíferos.

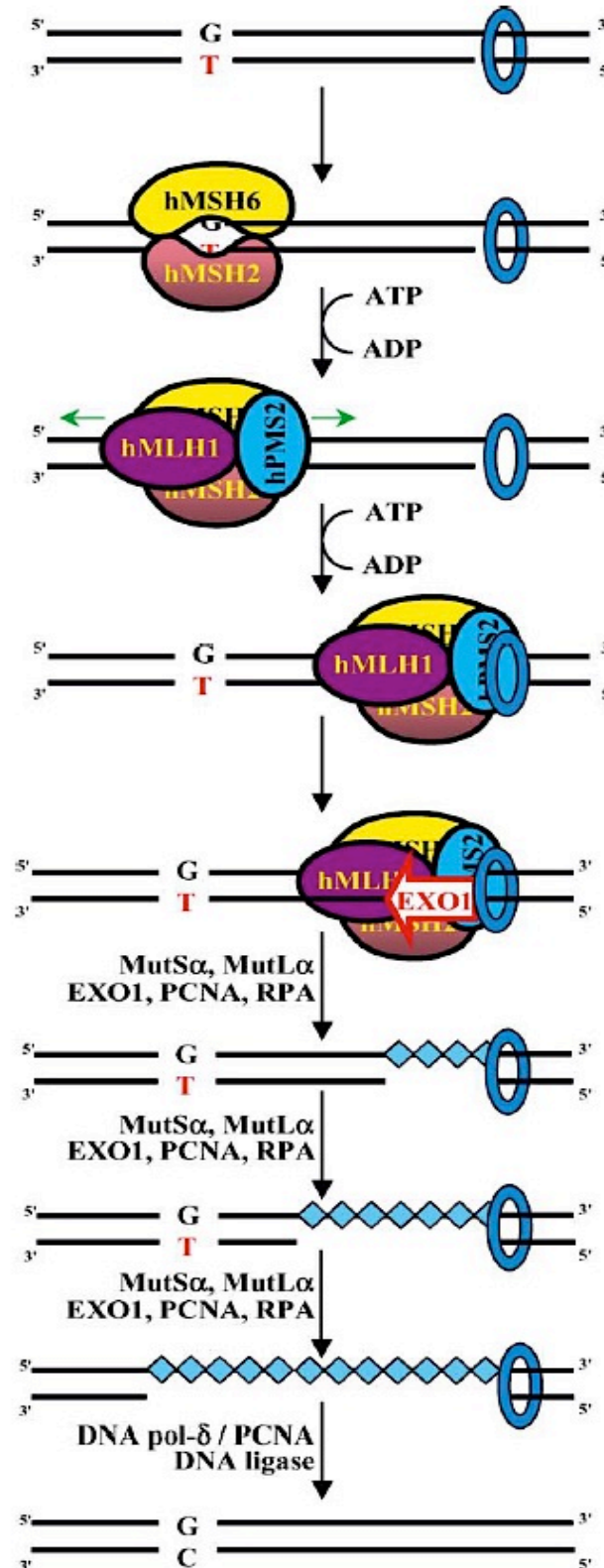
Proteína	Función
MSH2	Forma heterodímeros con MSH3 y MSH6 para: Reparar errores de replicación Reparar apareamientos incorrectos en intermediarios de recombinación Impedir recombinación entre secuencias no idénticas Mediar respuesta a daño en el ADN
MSH3	Forma heterodímeros con MSH2
MSH4	Forma heterodímeros con MSH5
MSH5	Forma heterodímeros con MSH4
MSH6	Forma heterodímeros con MSH2
PMS2	Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparar errores de replicación Reparar apareamientos incorrectos en intermediarios de recombinación Impedir recombinación entre secuencias no idénticas Respuesta a daño en el ADN
MLH1	Forma heterodímeros con PMS1, MLH2 y MLH3
PMS1	Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparar errores de replicación Reparar apareamientos incorrectos en intermediarios de recombinación
MLH3	Forma heterodímeros con MLH1 para reparar errores de replicación

Este sistema actúa a través de proteínas que, en un primer paso, se encargan de reconocer las distorsiones originadas en la estructura del ADN como consecuencia de la existencia de apareamientos incorrectos de bases. El modelo actual de funcionamiento del sistema post-replicativo MMR, sugiere que el proceso en Mamíferos comienza por el reconocimiento de las bases desapareadas. En células humanas, este proceso es mediado predominantemente por el complejo heterodimérico hMSH2/hMSH6. Dicho complejo unido al par de bases desapareadas sufre un cambio conformacional dependiente de ATP, convirtiéndose en una especie de pinza deslizante susceptible de deslizarse a lo largo del esqueleto de DNA. Al complejo hMSH2/hMSH6·ATP·DNA se le une un segundo heterodímero formado por la unión hMLH1/hPMS2, proceso igualmente dependiente de ATP.

Este complejo puede translocarse en ambas direcciones en busca de una cadena discontinua. Para que la base errónea pueda ser eliminada se necesita que exista una mella en la cadena alterada y, además, que la cadena molde antiparalela permanezca intacta. Además, en Eucariotas no parece existir una actividad endonucleásica asociada a las bases desapareadas. In vitro, se ha descrito que el complejo hMSH2/hMSH6·ATP·DNA asocia a una exonucleasa 5'-3', EXO-1, la cual elimina varios cientos de nucleótidos a partir de una mella situada hacia 5' de la base desapareada, avanzando hacia la base desapareada, la cual resulta eliminada. Mientras tanto la cadena sencilla de DNA molde permanece protegida por las proteínas RPA. La exonucleasa EXO-1 se mantiene activa según se van incorporando nuevas moléculas del complejo hMSH2/hMSH6·ATP·DNA, interrumpiéndose su

actividad cuando debido a la eliminación de la base desapareada se dejan de incorporar nuevas moléculas de hMSH2/hMSH6 al DNA. Entonces, se inicia la fase de relleno de la cadena mellada, interviniendo el sistema

enzimático replicativo DNA-polimerasa δ -PCNA. Finalmente, la DNA-ligasa sella la cadena reparada (ver Figura anexa, tomada de DNA Repair 2004; 3: 1091–1101).



Parece lógico pensar que cualquier alteración en las

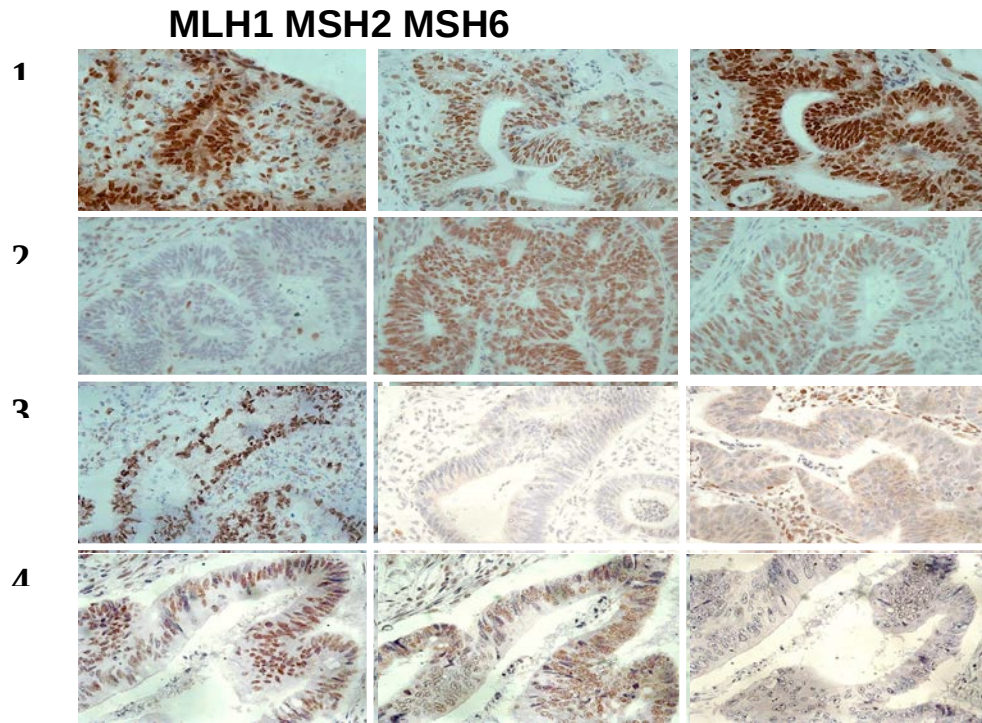
proteínas que intervienen en el correcto funcionamiento de

los sistemas de reparación citados, tendría que conducir a un incremento en la frecuencia de mutaciones en el ADN y, por tanto, estaría íntimamente relacionada con el cáncer. Sin embargo, únicamente algunos genes codificantes de proteínas reparadoras del ADN se han encontrado mutados en el cáncer. Entre estos destacan aquellos que codifican para las proteínas del sistema MMR.

Las alteraciones que afectan a las proteínas del sistema MMR (proteínas “Mut”) conducen a un acumulo de mutaciones en el ADN. Este hecho ocasiona lo que ha dado en denominarse “Fenotipo Mutador”. En humanos, las alteraciones en el sistema MMR se detectaron por primera vez en 1993, en tumores de colon, endometrio, ovario y otros órganos relacionados con el Síndrome del Cáncer de colon hereditario sin poliposis (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer o HNPCC). El estudio de estos tumores reveló que sus células tienen un elevado número de mutaciones y presentan, además, una gran inestabilidad en los microsatélites o secuencias cortas repetidas que se localizan a lo largo de todo el genoma. Si bien los microsatélites son secuencias pequeñas, sus alteraciones implican que los genes en los que se encuentran están sufriendo mutaciones. Sin embargo, se ha observado que la inestabilidad de microsatélites en células de cánceres humanos se asocia a alteraciones en ciertos genes codificantes para las proteínas que reparan los errores ocurridos durante la replicación del ADN. Son los genes MMR y se ha calculado que estos genes proporcionan al genoma humano un nivel de protección de 100 a 1000 veces frente a la aparición de mutaciones durante la replicación del ADN. Además del ya mencionado síndrome HNPCC, el modelo tumorigénico del fenotipo mutador se ha demostrado en otros tipos de cánceres humanos, entre los que cabe destacar el cáncer de colon esporádico. Aproximadamente entre 12-15% de estos últimos cursan por la vía carcinogénica del fenotipo mutador y también en estos la inestabilidad en microsatélites puede considerarse un indicador de alta tasa de mutación génica. Entre los genes del sistema MMR implicados, hasta la fecha, en el desarrollo de tumores humanos a través de la vía del fenotipo mutador cabe

destacar a hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hPMS1 y hPMS2. A pesar de que no hay certeza de que todos los casos con fenotipo mutador sean consecuencia de mutaciones en los genes MMR, lo cierto es que la presencia de estas alteraciones incrementa la tasa de mutaciones en todo el genoma y, serían responsables del desarrollo tumoral cuando estas alteraciones afectan a secuencias directamente relacionadas con la proliferación celular. Por tanto, el proceso puede iniciarse con la mutación de algún gen MMR, lo cual aumentaría enormemente la frecuencia de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, favoreciéndose la adquisición del fenotipo canceroso. La mayoría de las mutaciones en familias HNPCC se han encontrado en los genes hMLH1 y hMSH2. Estas mutaciones pueden ser puntuales (“missense mutations”) o cambiar el sentido de la lectura del mismo (“frameship mutations”). Estas últimas son más prevalentes y, habitualmente, introducen un codon de parada en la secuencia génica, con el resultado del truncamiento de la síntesis de la proteína correspondiente. Ello, ha permitido desarrollar un estudio inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras MMR en pacientes de riesgo, con el consiguiente valor diagnóstico (ver Figura adjunta, tomada de *Oncology Reports* 2004; 12: 621-629).

En la misma, se recogen una serie de inmunohistoquímicas (IHC) de tumores precedentes de familias HNPCC. Como puede observarse en el caso 1, dicho tumor expresa las tres proteínas objeto de estudio, a saber: MLH1, MSH2 y MSH6. Por el contrario, en el caso 2, el más frecuente en población española, se ha perdido la expresión de la proteína MLH1 debido al truncamiento de la misma, siendo positiva para las proteínas MSH2 y MSH6. En el caso 3, se ha perdido la expresión de la proteína MSH2 debido al truncamiento de la misma, siendo positiva para las proteínas MLH1 y MSH6. Finalmente, en el caso 4, el más infrecuente, se ha perdido la expresión de la proteína MSH6 debido al truncamiento de la misma, siendo positiva para las proteínas MLH1 y MSH2.



En población española, de los dos genes más alterados, es decir, los genes MLH1 y MSH2, el gen más alterado es el MLH1. Ambos genes presentan una gran penetrancia, de modo que un alto porcentaje de los miembros familiares que presenta la mutación en DNA sanguíneo llegan a desarrollar un cáncer colorrectal temprano. Algunas de las mutaciones descritas en dicha población en MLH1, lo han sido por primera vez en la literatura, en familias que fueron seleccionadas de acuerdo con los criterios de Amsterdam (ver Tabla 2, tomada de Human Mutation

2001; 18: 549). Sin embargo, no se han descrito dichas mutaciones en tumores colorrectales esporádicos con inestabilidad a microsatélites (RER+). Por el contrario, si se han descrito alteraciones epigenéticas en genes reparadores de los errores de replicación. En concreto, el gen MLH1 presenta una alta incidencia de inactivación del mismo por hipermetilación de su promotor. Sin embargo, no se ha descrito dicha hipermetilación en el gen MSH2, o en el MSH6.

TABLA 2: MUTACIONES EN LOS GENES MLH1 Y MSH2 EN FAMILIAS ESPAÑOLAS HNPCC

Table 2 Pathogenic mutations at the hMLH1 and hMSH2 genes in Spanish HNPCC families

Family	Clinical criteria	Nº of Tumors	Median age at onset (y)	Earliest age at onset (y)	Gen	Exon/Intron	Nucleotide Mutation	Amino acid change	Predicted consequence	MSI
48	Amsterdam	5C,1E,1Ov	42	23	MLH1	17	IVS 1990-1 G→A*	NA	Splice site loss	Yes
22	Amsterdam	5C,1Ov	44	26	MLH1	13	1420 del C*	Stop 490	Truncation	Yes
29	Amsterdam	4C	45	35	MLH1	13	1459 C→T	Stop 487	Truncation	Yes
7	Amsterdam	3C,1G,1Bld	60	42	MLH1	5	IVS 453 +2 T→C*	NA	Splice site loss	Yes
42	Amsterdam	3C,1G	36	27	MLH1	11	955 G→T*	Stop 319	Truncation	Yes
13	Amsterdam	5C,1E,1Ov,1GBs	42	34	MSH2	14	2239 del AT*	Stop 747	Truncation	Yes
53	Amsterdam	3C,1G,1Ut1Ure	41	27	MSH2	7	1165 C→T	Stop 389	Truncation	Yes
12	Bethesda 4	1C	45	45	MLH1	16	1852 AA→GC	K618A	Missense*	Yes
30	Bethesda 3	1C,1G	57	37	MLH1	16	1852 AA→GC	K618A	Missense*	Yes
30	Bethesda 3	1C,1G	57	37	MLH1	19	2146 G→A	V716M	Missense*	Yes
3	Bethesda 2	1C,1Gs,1Mg,1F	47	42	MLH1	19	2146 G→A	V716M	Missense*	Yes
44	Amsterdam	4C,2E	49	38	MLH1	16	1865 T→A*	L622H	Missense	ND

C: colon, G: gastric, Bld: bladder, Ov: ovarian, E: endometrial, GBs: glioblastoma, Gs: glioma, Mg: meningioma, F: fibrosarcoma, Ut: urotelial and Ure: ureter cancer; NA: not applicable; ND: not done; y: years; MSI: microsatellite instability; del: deletion ; * new mutation not previously reported; *Loss of Function in the yeast functional assay (36)

Estas alteraciones primarias descritas en familias HNPCC, dan pie a alteraciones secundarias de otros genes, los cuales contienen secuencias microsatélites en su marco de lectura. Dichas secuencias microsatélites presentan inestabilidad, lo cual es típico del fenotipo mutador. Así, se han descrito alteraciones en genes tales como el receptor de TGF-beta tipo II, el cual media una señal inhibidora esencial en la inhibición de la proliferación celular en células epiteliales, el gen Bax y el gen de la Apaf-1, estos dos últimos implicados en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Los datos existentes en la bibliografía indican que los adenocarcinomas colorrectales de naturaleza esporádica que presentan fenotipo RER+ se correlacionan con una menor agresividad que el grupo perteneciente al fenotipo RER-. Si bien el mecanismo molecular aún no ha sido esclarecido por completo, lo cierto es que estos tumores confieren una menor agresividad y los pacientes afectados presentan un pronóstico claramente más favorable. Datos recientemente publicados indican que los tumores RER+ podrían no desencadenar la activación de determinadas metaloproteasas necesarias para propiciar la invasión tumoral. Así, se han descrito en dichos tumores mutaciones en el promotor de la MMP3, las cuales inactivan su actividad transcripcional. Dichas mutaciones no se han encontrado en los tumores RER-. Esta menor expresión de MMP3 podría explicar la menor activación de la metaloproteasa MMP9 descrita en los tumores RER+ en comparación con los RER-, la cual es un indicador de mal pronóstico en cáncer colorrectal esporádico.

Los errores de apareamiento celular surgidos durante el proceso celular de la replicación del DNA en el transcurso

del ciclo celular, pueden producirse igualmente durante la recombinación homóloga o como resultado del daño del DNA. El resultado es que las células deficientes en el sistema MMR de reparación del DNA aumentan su frecuencia de recombinación, dado que el sistema MMR supone una barrera a las recombinaciones entre secuencias divergentes, jugando, por tanto, un papel crucial en la salvaguardia del genoma.

2.3. Recombinación homóloga y Cáncer

El daño en la doble cadena del DNA (DSB) es el de más riesgo para la integridad del genoma humano, ya que puede desencadenar una pérdida extrema del mismo. De hecho, dicho daño es muy frecuente y se estima su incidencia en 10 errores por célula y día en Mamíferos. Ello es debido, a que dichos errores de doble cadena (DSBs) se deben tanto a factores exógenos de tipo medio ambiental tales como las radiaciones ionizantes, o la exposición a agentes genotóxicos, como a factores endógenos tales como el colapso de la horquilla de replicación durante la replicación del ADN, o durante la reparación del DNA, o a mecanismos oxidativos mediados por los radicales libres (ROS). De hecho, la rotura por endonucleasas de la doble cadena del DNA forma parte del proceso de meiosis, así como del reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas. La persistencia de dichas roturas puede resultar en una parada del ciclo celular y apoptosis. La incorrecta reparación de los DSBs puede provocar una inestabilidad cromosómica en forma de pérdida cromosomal, amplificación génica o reordenamientos genéticos que pueden desencadenar un proceso canceroso. En consonancia con la magnitud del

daño del genoma, los mecanismos de reparación del daño de cadena doble son más complejos que los de cadena sencilla. De hecho, existen tres mecanismos de reparación del daño de cadena doble en Eucariotas, a saber: 1.- El mecanismo de unión de terminaciones no homólogas (NHEJ); 2.- El mecanismo de anillamiento de cadenas sencillas (SSA); 3.- La recombinación homóloga (HR). Mientras el mecanismo de NHEJ predomina en la reparación de los DSBs en las células en Go/G1, el de HR predomina en la reparación de los DSBs en células en fases S y G2 del ciclo celular. Dicha reparación cromosómica requiere el uso de la cromátida hermana a la dañada como molde, e implica toda una compleja maquinaria enzimática celular, a saber: El complejo MRN formado por las proteínas Mre11/Rad50/NBS1, la proteína de replicación A (RPA), Rad51, Rad52, el heterodímero Rad55/Rad57, Rad54 y en Eucariotas superiores los parálogos de Rad51 y la proteína BRCA2. La importancia individual de estos genes viene marcada por sus alteraciones patológicas de tipo monogénico. Así, los genes Rad51 o BRCA2 son letales embrionarios. El defecto en el gen NBS1 produce el Síndrome de Nijmegen. Las mutaciones en el gen Mre11 dan lugar a la enfermedad similar a la Ataxia-telangiectasia (ATLD). Ambas enfermedades presentan alterados los puntos de control del ciclo celular y reordenamientos cromosómicos. Finalmente, el gen BRCA2 conocido como el gen de la anemia de Fanconi D1, es de gran importancia oncológica. Así, sus mutaciones producen susceptibilidad a los cánceres de mama y ovario.

La recombinación homóloga (HR) puede jugar un papel fundamental en los mecanismos carcinogénicos. Tres modelos de carcinogénesis son los más comúnmente aceptados, a saber: 1.- El modelo más sencillo es el de una única alteración génica. Esta única alteración puede recaer en un oncogen, cuya ganancia de función puede producir el fenotipo tumoral. Así, puede ocurrir con alteraciones en oncogenes tales como c-ABL1, H-RAS, c-MYC, c-ERBB, v-FOS, y c-JUN. Alternativamente, el modelo de una única alteración génica puede recaer en un gen recesivo que presente una mutación, la cual conlleva generalmente una pérdida de heterozigosis (LOH). 2.- El modelo más sencillo de dos alteraciones es el que recae sobre genes recesivos que presentan pérdida de heterozigosis debido a la mutación de uno de los dos alelos por vía hereditaria o somática. Este es el caso de genes supresores tales como p53, p105Rb, o APC, cuya pérdida de función puede dar lugar al fenotipo tumoral. 3.- Finalmente, la carcinogénesis mediada por la aparición de múltiples alteraciones. El escenario más obvio sería la alteración primaria de la maquinaria de reparación del DNA, seguida de una acumulación secundaria de múltiples genes que afecten al fenotipo tumoral, o el desarrollo de una alta inestabilidad genómica. Estos pacientes con una tasa de inestabilidad genómica elevada tienen una mayor incidencia de cáncer que el resto de la población general, así como un desarrollo más temprano de ciertos tumores.

La HR puede jugar un papel fundamental en la pérdida

de heterozigosis como acontecimiento primario o secundario del proceso canceroso. Además, determinadas enfermedades que predisponen al desarrollo de cáncer tienen un fenotipo de inestabilidad genética, algunas de las cuales presentan una tasa elevada de HR. Dicha elevación de la tasa de recombinación homóloga celular hace que se pueda aumentar la LOH, pero además aumenta las probabilidades de que la HR cause reordenamientos cromosómicos aberrantes que puedan actuar como paso inicial en el proceso carcinogénico. De hecho, la HR es más prevalente en células proliferativas. Finalmente, las células cancerosas que tienen activado el sistema de HR desarrollan una tasa alta de inestabilidad genómica y, además, muestran una resistencia al tratamiento con quimioterápicos antineoplásicos.

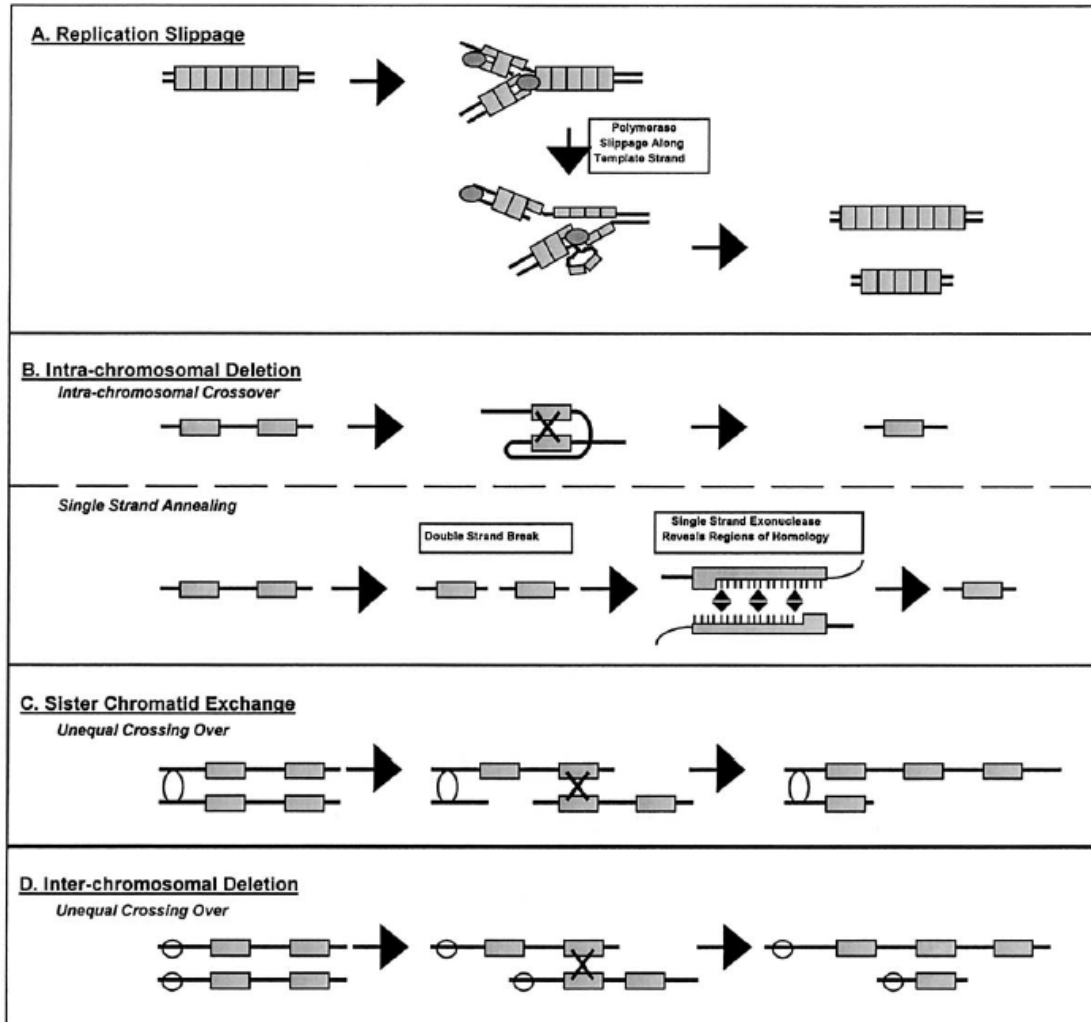
2.3.1. Mecanismos de pérdida de heterozigosis.

Hay tres mecanismos básicos que pueden producir una delección del DNA. A saber: 1.- Replicación deslizante. 2.- Recombinación intracromosomal. 3.- Recombinación intercromosomal (ver Figura anexa).

1.- La replicación deslizante puede producir delecciones durante la síntesis del DNA. Estas delecciones tienden ser pequeñas y restringidas a regiones con secuencias repetitivas de unos pocos nucleótidos. El ejemplo más común es la inestabilidad a microsatélites, un fenómeno muy prominente en el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC), el cual acumula errores asociados al proceso replicativo.

2.- Las delecciones intracromosomales son el resultado de recombinaciones aberrantes, muchas veces mediadas por regiones de homología, y pueden deleccionar regiones muy grandes del DNA. Hay varios mecanismos que pueden producir delecciones intracromosomales mediadas por HR, los tres más importantes son, a saber: 2.a. Entrecruzamiento cromosomal entre cromosomas homólogos no necesariamente asociado o no a la replicación celulares. El entrecruzamiento es mediado por secuencias homólogas alineadas, posiblemente seguida por una rotura de cadena sencilla lo cual permite la recombinación de dos secuencias homólogas y la delección de una secuencia de intervención. 2.b. Anillamiento de cadena sencilla. Este mecanismo requiere una doble rotura del DNA entre las secuencias homólogas. Una exonucleasa elimina el fragmento intermedio, de manera que los extremos rotos del DNA se anillan. 2-c. Intercambio de cromátidas hermanas desiguales asociado a la replicación celular, y en concreto a la fase G2 del ciclo celular, tras la replicación de las mismas pero antes de su segregación. El resultado es la formación de dos cromosomas recombinantes, uno deleccionado y otro triplicado.

3.- Las recombinaciones inter- o intra-cromosomales solo son distinguibles por la presencia o ausencia de un producto de duplicación recíproco. La presencia de duplicaciones en genes sugiere la existencia de un mecanismo de entrecruzamiento intercromosomal entre cromosomas homólogos (ver Figura anexa tomada de Experimental and Molecular Pathology 2003; 74: 94–105).



2.3.2. Alteraciones genéticas y recombinación homóloga

Assumiendo que los reordenamientos genéticos y las deleciones causan una proporción significativa de tumores, debería haber una correlación entre aquellas alteraciones genéticas que resultan en un aumento en la frecuencia de recombinación homóloga y la predisposición al cáncer. De hecho, existen varias enfermedades genéticas asociadas a un fenotipo de inestabilidad genética que desarrollan una alta frecuencia de desarrollar cáncer. Entre otra cabe destacar el Síndrome de Li-Fraumeni descrito por Livingstone en 1992, la ataxia-teleangiectasia (AT) descrita por Meyn en 1993 y los Síndromes de Lynch I y II de cáncer colorrectal familiar no polipósico (HNPCC) descritos por Lynch.

El Síndrome de Li-Fraumeni es una enfermedad hereditaria dominante caracterizada por el desarrollo temprano de cánceres. Entre los más prominentes destacan los carcinomas de mama, seguidos por los sarcomas, tumores cerebrales, leucemias, carcinomas de pulmón, carcinomas adrenocorticales, generalmente en niños o jóvenes adultos. El riesgo global de cáncer de estos

pacientes es del 100%, de entre los que un 50% desarrolla carcinoma de mama antes de los 50 años. Dichos pacientes son portadores por línea germinal de una mutación recesiva en el gen p53. Dicho gen puede inhibir la recombinación homóloga, por interacción con la proteína de la maquinaria de recombinación homóloga RAD51. La pérdida de función de p53 debido a una mutación genéticamente heredada asociada a la pérdida de heterocigosidad del alelo salvaje, trae como consecuencia un aumento de la frecuencia de recombinación homóloga celular.

La Ataxia telangiectasia (AT) es una enfermedad autosómica recesiva que cursa con inestabilidad cromosómica, radiosensibilidad y susceptibilidad al cáncer linfóide en la infancia. Aunque es una enfermedad rara, el 1% de la población general es heterocigota para mutaciones en el gen ATM. Estos portadores pueden tener predisposición a generar cáncer esporádico de mama. Las células procedentes de los pacientes con AT muestran inestabilidad cromosómica, tanto espontánea como inducida por radiaciones ionizantes o agentes radiomiméticos. El análisis citogenético revela una alta

incidencia de roturas cromosómicas, vacíos cromosómicos y aneuploidia. Tras la exposición a radiaciones ionizantes, las células de los pacientes de AT presentan una mayor incidencia de aberraciones cromosómicas comparadas con las células normales. Además, los ratones carentes del ATM presentan una mayor incidencia de recombinación homóloga (HR).

El gen ATM está implicado en la inducción de p53 en respuesta al daño cromosómico. De hecho, su papel es claramente multifuncional, incluyendo la fosforilación del gen BRAC1 tras la irradiación. Además, el gen ATM, a través del gen c-ABL1, está ligado a la proteína de HR RAD51. Al igual que en el caso de su interacción con p53, no se conoce como la interacción con RAD51 pueda afectar al mecanismo de recombinación homóloga (HR).

La mutación en el gen BRAC1 confiere un riesgo del 70% de contraer un cáncer de mama antes de los 70 años de edad. Además, las mutaciones en los genes BRAC1 y BRAC2 dan cuenta del 12-28% de los cánceres de mama premenopáusicos, los cuales presentan asociación familiar. La inactivación de BRAC1 o BRAC2 confiere inestabilidad genética a las células tales como aneuploidia o reordenamientos cromosómicos. De hecho, ambos genes juegan un papel central en la recombinación homóloga, de manera que su ausencia resulta en una deficiencia en la reparación de las roturas de cadena doble por HR. De esta manera, los genes BRAC1, BRAC2 y RAD51, de manera dependiente del gen ATM, forman focos en el núcleo celular tras el daño del DNA de doble cadena. De hecho, el gen RAD51 forma parte de un complejo formado por las proteínas RAD51, RAD52 y RAD54. La cinética de estos focos nucleares está alterada en las células deficientes en el gen ATM. No obstante, se desconoce la relación de estos focos nucleares y el mecanismo de recombinación homóloga (HR).

Aunque el síndrome de la AT está ligado a las mutaciones en el gen ATM, otras dos mutaciones resultan en síndromes que originariamente fueron confundidos con la enfermedad de AT. Estas variantes de AT son causadas por mutaciones en el gen NBS (Síndrome de rotura de Nijmegen) y en el gen MRE11A. Estas dos variantes presentan un fenotipo similar a la enfermedad de AT, incluyendo la inestabilidad cromosómica. De hecho, los genes NBS, MRE11A y RAD50 forman un complejo modulado por el gen NBS, tras su fosforilación por el gen ATM en respuesta al daño cromosómico.

3. INTEGRIDAD DE LOS EXTREMOS TELOMÉRICOS Y CÁNCER

3.1. Telomerasa y Telómeros

La telomerasa es la enzima que utilizan la mayoría de los organismos eucarióticos para el mantenimiento de sus telómeros. Mediante la incorporación de secuencias teloméricas en el extremo 3' de los cromosomas se equilibra la pérdida de nucleótidos que tiene lugar con cada división celular, como consecuencia del problema de la replicación terminal. Los telómeros son estructuras

especializadas formadas por ADN y proteínas que constituyen, por tanto, los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos. Son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de los cromosomas y para la viabilidad celular. El ADN telomérico consiste en repeticiones en tándem de secuencias nucleotídicas cortas ricas en residuos de guanina en dirección 5'→3'. Aunque todos los telómeros de un mismo genoma presentan las mismas repeticiones, éstas varían entre las distintas especies, si bien es notable la gran conservación que existe en las secuencias teloméricas de especies tan distantes en la evolución como vertebrados, plantas y protozoos. En el caso de los telómeros humanos la secuencia que se repite es TTAGGG. En asociación con el ADN telomérico, se sitúan distintas proteínas cuyas funciones se resumen en la Tabla 3.

Los telómeros no sólo actúan como los extremos físicos de los cromosomas que impiden la pérdida de secuencias codificantes, sino que además desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento de la función cromosómica. Así, protegen a los cromosomas de procesos de degradación, fusión y recombinación que amenazarían la integridad cromosómica, participan en la organización de la arquitectura nuclear, desempeñando un papel crítico en la segregación cromosómica durante la mitosis y meiosis, e intervienen en funciones de regulación de la expresión génica, mediante el fenómeno conocido como TPE (Telomere Position Effect).

3.2. Telomerasa: componentes y actividad

Desde su identificación en Tetrahymena, la telomerasa ha sido estudiada y caracterizada en diversos organismos eucarióticos, entre los que se incluyen ciliados, levaduras, ratones y humanos. Hasta la fecha, todas las telomerasas conocidas son ribonucleoproteínas ADN polimerasas que constan de un componente ARN y de diversos componentes de naturaleza proteica, entre los que destaca la subunidad catalítica de la enzima. El componente ARN de la telomerasa humana, denominado hTR, está codificado por un gen de copia única localizado en 3q26.3. Su transcripción por la ARN polimerasa II y posterior procesamiento en el extremo 3', produce un transcrito maduro de 451 nucleótidos. La región molde para la transcripción inversa, complementaria a la secuencia del ADN telomérico humano (TTAGGG)_n está próxima al extremo 5' y comprende 11 nucleótidos de secuencia 5'-CUAACCCUAAC - 3'. La subunidad catalítica de la telomerasa humana, hTERT, está codificada por un gen de copia única de 40 kb localizado en 5p15.33 compuesto por 16 exones y que genera una proteína de 127 kDa con 1132 aminoácidos. En su extremo N- terminal presenta un dominio T específico de la telomerasa, pues no se encuentra presente en ningún otro tipo de proteínas. En el extremo C-terminal existen siete motivos responsables de la actividad catalítica, motivos RT, comunes a la familia de las transcriptasas inversas (RTs) que incluyen ciertos residuos de aspártico esenciales para la actividad retrotranscriptasa.

La expresión de hTR se ha demostrado en numerosos tejidos, tanto normales como neoplásicos, con independencia de la actividad telomerasa, por lo que no parece ser el componente limitante de la actividad de la enzima. A diferencia del componente ARN, la expresión de hTERT está limitada a tejidos con actividad telomerasa. El gen que codifica para la proteína se expresa a niveles altos en tumores primarios, líneas celulares inmortales y tejidos telomerasa-positivos, pero no en tejidos sin actividad telomerasa. La expresión ectópica de hTERT en células telomerasa-negativas es suficiente para reconstituir la actividad telomerasa. Además, el nivel de expresión del ARNm de hTERT se correlaciona con el nivel de la actividad enzimática del complejo telomerasa. Todos estos estudios apoyan el papel de hTERT como factor limitante de la actividad telomerasa. Si bien la coexpresión de hTR y hTERT es suficiente para reconstituir la actividad telomerasa *in vitro*. Sin embargo, estudios bioquímicos y genéticos sugieren que *in vivo* son necesarios ciertos factores adicionales a este núcleo mínimo, los cuales podrían estar implicados en la biogénesis y ensamblaje de la enzima activa, así como en la regulación del acceso a su sustrato, los telómeros.

Desde el descubrimiento del problema de la replicación terminal y la implicación de los telómeros y la telomerasa en el mismo, distintos estudios plantearon un posible papel de los telómeros en el control de la senescencia celular, que llevaron al planteamiento de la llamada hipótesis telomérica. Esta hipótesis propone que la pérdida telomérica progresiva es un factor limitante en la capacidad replicativa celular y emite una señal que desencadena la entrada en senescencia, de tal modo que los telómeros actúan a modo de reloj mitótico que controla el número de divisiones que una célula puede experimentar. Según el modelo de la hipótesis telomérica (Figura 5), en los tejidos germinales y en una minoría de los tejidos somáticos con alta tasa de proliferación, la longitud de los telómeros se mantiene a medida que las células se dividen debido a la presencia de la telomerasa. Sin embargo, en la mayoría de tejidos somáticos, los telómeros sufren un acortamiento progresivo, pues carecen de la enzima. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, las células entran en la fase de mortalidad 1 (M1), donde sufren una parada prolongada del ciclo celular en G1 y, al cabo de cierto tiempo, mueren. El estímulo que induce la parada del crecimiento son las señales de lesión del ADN que se emiten como respuesta a la pérdida telomérica. En estas condiciones, existen células capaces de evadir la senescencia, por ejemplo, células transformadas con oncogenes virales que tienen inactivadas las vías controladas por p53 y Rb. Estas células son capaces de ignorar los avisos para detener su crecimiento y adquieren una ampliación de su capacidad replicativa en la que siguen acortando sus telómeros. Esta ampliación es limitada y finaliza en la fase de mortalidad 2 (M2) o crisis, en la cual la mayor parte de las células han acumulado gran cantidad de alteraciones cromosómicas y sufren apoptosis de manera masiva. Según este modelo, la

reactivación de la actividad telomerasa, o de cualquier otro mecanismo capaz de mantener la longitud telomérica, estabiliza el acortamiento de los telómeros, lo cual trae como resultado un escape de M2 y la adquisición de la inmortalidad celular.

3.3. Mecanismos de mantenimiento telomérico alternativos a la telomerasa (ALT)

Si bien la activación de la telomerasa es el mecanismo predominante para el mantenimiento de la función y longitud telomérica, distintos organismos eucarióticos emplean otras alternativas de regulación telomérica que no incluyen a la telomerasa. En el caso de células humanas también se conocen mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico o ALT (Alternative Lengthening of Telomeres), basados en procesos de recombinación homóloga que implican específicamente a los telómeros. Estos mecanismos se han descrito en líneas celulares y en tumores primarios que mantienen sus telómeros en ausencia de actividad telomerasa. Una de las características de las células humanas con ALT, y que permite su detección, es la presencia de telómeros muy largos y heterogéneos, así como la existencia de unas estructuras nucleares denominadas APBs (ALT-associated PML bodies).

3.4. Telómeros, Telomerasa y cáncer

Lo expuesto en los párrafos anteriores de este apartado, con respecto a la conexión entre el mantenimiento de los telómeros y la regulación de las funciones replicativas celulares, implica que las alteraciones en la biología telomérica juegan un papel importante en la transformación celular maligna. En apoyo de esta hipótesis existen en la bibliografía distintos trabajos de investigación en los que se demuestra la reactivación de la telomerasa en la mayoría de los tumores humanos, y la ausencia de esta enzima en los tejidos normales. Los últimos estudios indican que durante las etapas tempranas de la transformación celular, la longitud de los telómeros actuaría limitando la expansión celular; sin embargo, en etapas más avanzadas, coincidiendo con la reactivación de la telomerasa o con la actuación de mecanismos alternativos a la misma (ALT), la oncogénesis se facilitaría (Tabla 4). Por otro lado, además de la función de los telómeros facilitando la inmortalización celular, estas secuencias determinan otro aspecto crítico en la transformación maligna. El acortamiento de los telómeros conduce a la senescencia celular, un proceso que se acompaña de fusiones cromosómicas e incremento de la inestabilidad genómica. Como consecuencia de estos cambios en la estructura genómica, se ha observado que se activa la telomerasa o se ponen en marcha los mecanismos ALT, lo cual facilita la inmortalización celular. Sin embargo, este incremento de la inestabilidad genómica causado por el acortamiento telomérico y la pérdida de la función protectora de los telómeros, puede también conducir a la transformación maligna, en ciertas condiciones. De hecho existen suficientes evidencias que

relacionan el mantenimiento de las secuencias teloméricas, fundamentalmente por reactivación de la telomerasa, y el cáncer.

3.5. Implicaciones clínicas de la telomerasa en cáncer

La detección de la actividad telomerasa en células tumorales in vivo fue descrita por primera vez en 1994, gracias al desarrollo de un método sencillo conocido como TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). Desde entonces, y gracias a numerosas modificaciones del ensayo original, se ha procedido al análisis de la actividad telomerasa en los diferentes tipos de tumores humanos primarios, así como en tumores metastásicos, lesiones premalignas, tumores benignos y muestras de tejidos normales adyacentes a los correspondientes tumores. Globalmente, alrededor del 85% de los tumores analizados hasta la fecha presentan actividad de la enzima. Los avances logrados en los últimos años, en relación con el entendimiento del papel de los telómeros y de la telomerasa en la patofisiología del cancer humano, indican que las estrategias encaminadas al análisis de la longitud telomérica y de la actividad telomerasa pueden tener una gran utilidad en el establecimiento del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los procesos cancerosos humanos. En particular, la telomerasa se ha convertido, en los últimos años, en una diana atractiva para el diseño de compuestos útiles en terapia anticancerosa.

3.5.1. Utilidad de la telomerasa en el diagnóstico del cáncer

La fuerte asociación existente entre la actividad telomerasa y la malignidad celular ha ofrecido la posibilidad de utilizar la telomerasa como marcador en el diagnóstico del cáncer. El empleo de métodos de detección de la enzima de alta sensibilidad y especificidad basados en el ensayo TRAP, así como su análisis a bajo coste en una amplia variedad de muestras, desde biopsias hasta distintos tipos de fluidos corporales que reducen la invasividad, ha potenciado la utilidad de la telomerasa como marcador diagnóstico en distintos tipos tumorales. Además, también puede constituir una herramienta de gran valor en la detección precoz del cáncer o de las metástasis tempranas. Para ello, resulta de vital importancia conocer la expresión diferencial de la telomerasa en los distintos tejidos del organismo. En el caso de la detección precoz, es especialmente relevante conocer la expresión de la enzima durante los estadios benignos, tempranos y avanzados del tumor. Así, por ejemplo, en el caso de la carcinogénesis colorrectal, uno de los modelos mejor caracterizados en lo que respecta a las alteraciones moleculares que tienen lugar en cada etapa del proceso, se ha demostrado que la reactivación de la telomerasa parece ser un evento obligado en la transición de adenoma a carcinoma. Es más, se ha llegado a postular que dicha reactivación tiene lugar después de la mutación en K-ras pero antes de que se produzcan mutaciones en p53. Asimismo, en el desarrollo de carcinomas de tiroides, se ha visto que los estadios benignos y menos avanzados presentan niveles bajos o

indetectables de actividad telomerasa.

3.5.2. Papel de la telomerasa como marcador pronóstico en cáncer

La utilidad de la telomerasa como marcador pronóstico en cáncer se basa en estudios llevados a cabo en distintos tipos celulares, a partir de los cuales se ha postulado que la presencia o no de actividad telomerasa determina, respectivamente, la infinita o finita capacidad proliferativa de las células que integran los distintos tumores. En base a estos análisis, se ha propuesto que los tumores pueden ser divididos en dos grupos: aquellos que contienen células inmortales y aquellos que, por el contrario, carecen de ellas. La correlación entre telomerasa y pronóstico clínico se ha puesto de manifiesto en determinados tipos de cáncer. Así, en cáncer de pulmón, analizando una amplia población de carcinomas no microcíticos (CNMP) y de carcinomas microcíticos (CMP), se observó que los tumores pertenecientes al primer grupo presentaban actividades que oscilaban entre niveles prácticamente inexistentes hasta niveles altos. Sin embargo, en todos los carcinomas microcíticos de pulmón analizados, se observaron niveles muy altos de actividad de la enzima. Estos datos concuerdan con el hecho de que los carcinomas microcíticos de pulmón presentan globalmente un peor pronóstico. Asimismo, la actividad telomerasa se ha correlacionado con mal pronóstico en cáncer gástrico, en cáncer de mama, o en cáncer colorrectal. Por otro lado, en leucemias agudas, una elevada actividad telomerasa se asocia con un desenlace clínico adverso y, además, se ha observado que la actividad enzimática decrece durante la fase de remisión de la enfermedad.

Todos estos datos demuestran que la detección de la actividad telomerasa puede constituir un marcador molecular útil, tanto para predecir el desenlace del cáncer, como a la hora de aportar nuevos datos acerca del tratamiento mas adecuado, en cada caso. Así pues, un pronóstico basado en la detección de la telomerasa puede ser de gran ayuda en el caso de tumores que experimentan recurrencias, ya que en estos casos se podría establecer una terapia adyuvante más agresiva. El papel de la telomerasa como marcador pronóstico podrá ser, por tanto, más relevante en aquellos tipos de neoplasias para las que existen tratamientos definidos en base al grado de agresividad del tumor.

3.5.3. La telomerasa como marcador de progresión tumoral

Aparte de su posible utilidad en lo que a diagnóstico y pronóstico se refiere, el estudio de la actividad telomerasa puede utilizarse como marcador de progresión tumoral. Así, la detección de dicha actividad puede ser útil en la monitorización de la efectividad de las terapias antineoplásicas clásicas, puesto que el nivel de actividad de la enzima podría emplearse para determinar el número de células inmortales presentes en un paciente sometido a tratamiento. Estas determinaciones permitirían reducir, por ejemplo, en el caso de trasplantes autólogos de médula

ósea, el número de recurrencias debidas a la presencia de células cancerosas no detectadas previamente.

3.5.4. Inhibición de la telomerasa y su utilidad en la terapia antitumoral

La presencia de la telomerasa en un alto porcentaje de tumores humanos y su ausencia en la gran mayoría de células normales, indican que la inhibición de la enzima podría constituir una alternativa a las estrategias actuales contra el cáncer. Los inhibidores de la telomerasa producirían un acortamiento telomérico progresivo que conduciría finalmente al estado de senescencia y, por ello, a una eventual destrucción de las células tumorales. Puesto que las células continuarían proliferando hasta que sus telómeros alcanzaran una longitud crítica, estas terapias anti-telomerasa serían especialmente útiles como tratamiento adyuvante de las terapias actuales, a fin de evitar recidivas debidas a la presencia de células tumorales que no hayan sido eliminadas por completo con los tratamientos convencionales. Con respecto a los posibles efectos adversos, se piensa que la importancia de los mismos sería inferior a las terapias actuales.

Hasta la fecha se han desarrollado distintas clases de agentes inhibidores de la telomerasa, entre los que se encuentran oligonucleótidos antisentido contra el componente ARN, mutantes dominantes negativos de la subunidad catalítica, así como moléculas de pequeño tamaño con alta especificidad por la enzima, si bien ninguno de ellos se utiliza aún en clínica.

Otras líneas de investigación están dirigidas a la obtención de vacunas contra la telomerasa. Se trataría de estimular el sistema inmune para que reconociera las células telomerasa positiva y las eliminara. Estas vacunas, en principio, no afectarían a las células normales de tejidos de alto recambio, dado que éstas presentan niveles bajos de actividad de la enzima. Por el contrario, las células tumorales son capaces de expresar con frecuencia componentes de la telomerasa unidos a moléculas del sistema principal de histocompatibilidad, con lo que serían reconocidas como dianas de destrucción.

4. BIBLIOGRAFÍA

Bishop AJR, Robert H. Schiestl RH. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003; 74: 94–105.

Blasco MA. Telomeres and cancer: a tail with many ends. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 70–6.

Bryant PE. Repair and chromosomal damage. *Radiotherapy and Oncology*. 2004; 72: 251–6.

Caldes T, Godino J, Sánchez de Abajo A, Corbacho, C, de la Hoya M, Asenjo JL, Saez C, Sanz J, Benito M, Ramón y Cajal S, Diaz-Rubio E. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 AND MSH6 mutations carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncology Rep*. 2004; 12: 621–9.

Godino J, de la Hoya M, Diaz-Rubio E, Benito M, Caldés, T. Eight novel germline MLH1 and MSH2 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer families from Spain. *Human Mutation*. 2001; 18: 549.

Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 2034–43.

Hendricks CA, Engelward BP. “Recombomice”: The past, present, and future of Recombination-detection in mice. *DNA Repair*. 2004; 3: 1255–61.

Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Op Gen Dev*. 2003; 13: 61–69.

Morán A, Iniesta P, de Juan C, González-Quevedo R, Sánchez Pernaute A, Diaz-Rubio, E, Ramón y Cajal S, Torres, A, Balibrea JL, Benito M. Stromelysin-1 promoter mutations impair gelatinase B activation in High-Microsatellite-Instability sporadic colorectal tumors. *Cancer Research*. 2002; 62: 3855–60.

Richardson C, Horikoshi N, Pandita TK. The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair*. 2004; 3: 1149–64.

Rubbi CP, Milner J. p53-guardian of the genomes guardian? *Cell Cycle*. 2003; 2: 20–21.

Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002; 2: 257–65.

Shamoo Y. Structural insights into BRCA2 function. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003; 13: 206–11.

Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and Cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 677–85.

Shaw CJ, James R, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics*. 2004; 13: 1 R57–R64.

Shin DS, Chahwan C, Huffman JL, Tainer JA. Structure and function of the double-strand break repair machinery. *DNA Repair*. 2004; 3: 863–73.

Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: Molecular mechanisms and biological functions. *Annu. Rev. Microbiol*. 2003; 57: 579–608.

Shivji MKK, Venkitaraman AR. DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA Repair*. 2004; 3: 835–43.

Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair*. 2004; 3: 1091–1101.

Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci*. 2001; 114: 3591–8.



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el cuarto trimestre del año 2015, la Academia ha realizado numerosas Sesiones entre ellas diez Sesiones científicas dedicadas a tomas de posesión de nuevos Académicos, uno de Honor, y dos Correspondientes; conferencias varias, cuatro Mesas Redondas; tertulias científicas de temas de actualidad, y una Sesión Conmemorativa de los Premios Nobel 2014, Reunión con Diputados y Senadores, y de eminentes conferenciantes españoles y extranjeros entre todas ellas.

El 1 de octubre, tuvo lugar la Conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre "*El compromiso con la Sociedad, en nuestro ADN. La Responsabilidad Social forma parte de la identidad de la industria farmacéutica*". Impartida por Dr. Antoni Esteve Cruella, Presidente de Farmaindustria y del Consejo de Administración de Esteve Teijin Healthcare.

La industria farmacéutica está comprometida con la salud y con el bienestar de los ciudadanos. De todos los ciudadanos, por eso cada año trabaja más en ámbitos como los de las enfermedades raras o las enfermedades tropicales desatendidas. Pero su compromiso con la sociedad va mucho más allá. Es un sector implicado en la generación de innovación; en la creación de empleo cualificado y de calidad; en la formación continuada de los profesionales sanitarios y de los representantes de los pacientes; o, especialmente, en colaborar con la sostenibilidad del sistema sanitario. Además nuestras empresas se identifican en la lucha por la protección del medio ambiente, con iniciativas como Sigre; o con el desarrollo científico y tecnológico de nuestro país. Es un compromiso y una responsabilidad con la sociedad, por tanto, que va mucho más allá del medicamento y que pretende colaborar en la construcción de una sociedad más sana, más avanzada y más equitativa. El Dr. Antoni Esteve fue presentado por el Académico de Número el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega.

El 8 de octubre, se celebró la Sesión Solemne de Toma de Posesión como Académico de Honor de Excmo. Sr. D. Juan José Badimón, Profesor de Medicina Cardiológica y Director de Atherothrombosis Research Unit Icahn School of Medicine en el Hospital Mount Sinai. Nueva York. USA, quien pronunció su discurso titulado: "*Bases Fisiopatológicas en la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares*".

Explicó que la enfermedad aterosclerótica y sus manifestaciones clínicas (infarto de miocardio, embolia, y angina de pecho) son la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. El futuro no es más esperanzador que en la actualidad, ya que se estima un impacto incremental a consecuencia de la mayor presencia de los factores de riesgo cardiovasculares (edad, obesidad, diabetes, etc) especialmente en los países de baja y media renta per capita lo que la convierten en problema clínico y social de la mayor importancia a nivel mundial. Durante la conferencia se expusieron las evidencias fisiopatológicas e epidemiológicas responsables de la génesis y progresión de esta enfermedad. Evidencias que han generado las bases racionales para el desarrollo de estrategias terapéuticas para la prevención y tratamiento de esta enfermedad. De un modo mas específico, se revisaron las intervenciones que se tienen en cuenta en el control de los niveles lipídicos elevados respecto a los controles. Se expusieron no solo los beneficios y la efectividad de las "*estatinas*", y también dedicó parte de su exposición a una mayor atención a la nueva generación de medicamentos hipolipemiantes como son los inhibidores de la proteína transportadora de los esteres del colesterol (CETP) y los inhibidores de la proteína PCSK9. Esta clase de agentes son capaces de conseguir un efecto hipolipemiante mucho mas marcado. Dado el papel de la trombosis aguda en las enfermedades cardiovasculares, también se contempló el significado que los agentes antiplaquetarios desempeñan en la prevención y tratamiento de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. Fue presentado por el Académico de Número de la RANF el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez.

El 22 de octubre, tuvo lugar el importante acto de celebrar en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, la primera SESIÓN DE LA "CÁTEDRA JUAN ABELLÓ" en la que nuestro compañero académico el Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo, Académico de Número de la corporación impartió la conferencia titulada "*Opiáceos y tratamiento del Dolor*". La Cátedra fue presentada por el Académico de Número de la Corporación el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez.

El 29 de octubre tuvo lugar también en esta sede RANF, en colaboración con la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE) y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, la celebración de la Mesa Redonda titulada *"Avances en Nutrición Clínica: de la dietoterapia a la nutrición parenteral"*. Contó con la presentación del Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena, Vicepresidente de la RANF y del Ilmo. Sr. D. Miguel León Sanz, Presidente de la SENPE. Moderada por el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz, Académico de Número. Contó con las ponencias de la Dra. Cleofé Pérez Portabella, Graduada en Enfermería y Nutrición Humana y Dietética y Profesora de Nutrición Humana y Dietética de la Universidad de Vich: "Contribución de la Enfermería y de la Dietética al manejo nutricional de los pacientes hospitalizados"; y el Dr. Daniel Cardona Pere, Adjunto del Servicio de Farmacia Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, que disertó sobre: "Papel del farmacéutico de hospitales en el equipo multidisciplinar de soporte nutricional".

El 5 de noviembre ingresó como Académica Correspondiente la Ilma. Sra. Dña. María Soledad Campos Díez, Profesora Titular de Historia del Derecho y de las Instituciones, quien pronunció su discurso titulado: *"La organización farmacéutica del Protectorado español en Marruecos"*. Disertó sobre las coordinadas espacio/tiempo de la Zona de influencia española en el Protectorado de Marruecos sobre la que se le encomendó a nuestro país responsabilidades en materia militar, orden interno y política internacional, sirvió de marco a la materia objeto de esta comunicación la participación de las instituciones sanitarias y especialmente de los farmacéuticos civiles y militares que allí ejercieron su actividad. Tuvo lugar en la época un cambio de paradigma farmacológico en cuanto a elaboración, dispensación y control de medicamentos según el modelo europeo contemporáneo. Y fue muy importante la huella dejada por la reglamentación y acción sanitaria española tras la independencia marroquí. El tema se abordó desde la consulta de fuentes documentales primarias (Archivo General del Palacio Real de Madrid, Archivo Histórico Militar y Biblioteca Nacional) y legislativas (Novísima Recopilación e las Leyes de España, Boletines Oficiales del Estado y de la Zona), además de la utilización de la prensa e historiografía coetánea y contemporánea. Fue presentada por el Académico de Número de la RANF, el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento.

El 12 de noviembre y en continuidad de la colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, se celebró la Mesa Redonda titulada *"Medicina Regenerativa"* que fue presentada por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y contó con las ponencias de los Dres: Prof. Juan Carlos Izpisua Belmonte, director del Gene Expression Laboratory, del Instituto Salk de Estudios Biológicos de la Universidad La Jolla, California, USA, que habló sobre el *"Presente y Futuro de la Medicina Regenerativa"* y del Prof. Pedro Guillén García, Académico Correspondiente de la RANF y de la RANM, y Fundador y Director de la Clínica CEMTRO, que disertó sobre *"Aplicación de Medicina Regenerativa en España desde 1996 en la articulación dañada (rodilla, tobillo y cadera)"*

El 19 de noviembre, y en colaboración con al Fundación José Casares Gil tuvo lugar en la sede académica de la RANF, se tuvo el honor de celebrar la Mesa Redonda entre dos Academias del Instituto de España, la de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y la de Farmacia, sobre el interesante y actual tema *"Campos electromagnéticos y salud"*. Fue presentada por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y contó con las ponencias de los Académicos: Excmo. Sr. D. Antonio Hernando Grande, Académico de Número de la RACEFYN, que habló sobre *"Características y dosis de los campos electromagnéticos en nuestro ambiente"* y el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico de Número de la RANF, cuya conferencia trató los *"Efectos fisiológicos de los campos electromagnéticos en función de la dosis (s. Paracelso)"*.

El 26 de noviembre, tuvo lugar la interesante exposición en Sesión Científica Conmemorativa de los Premios Nobel 2015 en Fisiología o Medicina y en Química. La presentación estuvo a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la RANF. El ponente sobre el Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina fue el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, cuya atractiva conferencia la tituló *"Jaque al dolor y muerte a los parasitismos"*; y la conferencia expositiva sobre el Premio Nobel 2015 en Química corrió a cargo del Ilmo. Sr. D. Manuel R. Benito de las Heras, Académico Correspondiente de esta institución, que nos habló de forma excelente y pedagógica para el numeroso público asistente sobre *"Los mecanismos reparadores del ADN: Una ventana de oportunidad para la investigación en oncología"*.

El 3 de diciembre tuvo lugar el Acto de Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Ilma. Sra. Dña. Beatriz de Pascual-Teresa. Decana de la Facultad de Farmacia CEU San Pablo. Es Licenciada y Doctora en Farmacia por la Universidad de Salamanca, Premio Extraordinario de Licenciatura y Doctorado. Profesora en la Universidad CEU San Pablo desde 1996 donde es actualmente Catedrática de Química Orgánica en la Facultad de Farmacia. Desde 2008 es Decana de la Facultad de Farmacia y desde 2011 Secretaria de la Conferencia Nacional de Decanos de Facultades de Farmacia de España. Se especializó en la utilización de herramientas computacionales para el estudio de la estereoselectividad en la reacción de Diels-Alder en el grupo del Prof. K. N. Houk en UCLA. Durante este período realizó uno de los primeros trabajos sobre el diseño y preparación de un anticuerpo catalítico capaz de controlar la evolución de esta reacción. Más tarde se especializó en el estudio de interacciones ligando receptor, fenómenos de reconocimiento molecular y diseño de fármacos asistido por ordenador en el grupo del Prof. F. Gago en la Universidad de Alcalá, donde trabajó fundamentalmente con agentes intercalantes de ADN. Tras su incorporación a la Universidad CEU San Pablo trabajó primero en el grupo del Prof. M. Fernández Braña en el diseño de agentes mono y bisintercalantes y en inhibidores de CDK2. Desde el año 2003 trabaja junto con la Dra. Ana Ramos en el diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos

farmacológicamente activos frente a diferentes dianas: Adrenomedulina y PAMP; Receptor de Estrógenos, metaloproteinasas de la matriz MMPs, HDAC y la sinergia entre MMP2 y CK2. Imparte docencia en los grados en Farmacia y Biotecnología en español y en inglés (Química Farmacéutica I y II, Bioinformática, Química e Ingeniería de Proteínas, Biotecnología); en distintos Másteres: Master interuniversitario en Descubrimiento de Fármacos y Máster interuniversitario en Química Orgánica experimental e industrial y participa y coordina el Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología de la Salud de la CEINDO (CEU Escuela Internacional de Doctorado).

La Dra. Pascual-Teresa leyó su conferencia titulada: *"El modelado molecular en el diseño de compuestos antitumorales"*, en la que explicó que, la utilización de métodos computacionales en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos tiene muchas terminologías: diseño de fármacos asistido por ordenador, química computacional, modelado molecular o métodos in silicio.

Estos métodos se pueden utilizar en todas las fases del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos y hacen uso de una diversidad de técnicas basadas tanto en la mecánica molecular, como en la mecánica cuántica. La apropiada combinación y aplicación iterativa de modelado molecular, síntesis orgánica y evaluación biológica, ha proporcionado un gran número de prototipos interesantes y candidatos a fármacos. Se presentaron resultados de trabajos realizados en su grupo de investigación, en los que se han utilizado diferentes métodos de modelado molecular para el diseño y optimización de moduladores de la actividad de dianas implicadas en cáncer como metaloproteasas de la matriz, CK2 y PAMP. Fue presentada por la Académica de Número, la Excm. Sra. Dña. Carmen Avendaño López.

El 10 de diciembre en la sede Académica RANF y auspiciada por la Fundación José Casares Gil, de celebró la Mesa Redonda titulada: *"Envejecimiento"*. Fue coordinada por el Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno, Académico de Número de la RANF, y contó con los ponentes: Excmo. Sr. D. José Manuel Ribera Casado, Académico de Número de la RANF, que trató los *"Cambios fisiológicos durante el envejecimiento"*. Explicó que el envejecimiento se caracteriza esencialmente por una pérdida progresiva y paulatina de los mecanismos de reserva, lo que determina un aumento paralelo de la vulnerabilidad y con ello una mayor patología y acusadas posibilidades de fracasos patológicos a la largo de la vida. Estas pérdidas a medida que avanza la edad en nuestra fisiología y bioquímica vienen condicionadas por dos vías: a.- Causas primarias (envejecimiento intrínseco o fisiológico) determinadas por nuestra propia carga genética. Condiciona el 25% de los cambios operados a lo largo de la vida; b.- Factores secundarios (causas extrínsecas o epigenéticas) derivadas de la historia previa de cada sujeto (secuelas de enfermedades, de cirugía, de accidentes, etc.); y c. - al ambiente y de los FR a que hemos estado sometidos. Condiciona el 75% de los cambios. Ello se traduce en una serie de modificaciones en todos y cada uno de los sistemas y aparatos de nuestro organismo, con una cadencia y una variabilidad interindividual importante y progresiva a lo largo de la vida, que fueron presentados de manera sumaria a lo largo de la sesión.

El siguiente ponente, el Ilmo. Sr. D. Gustavo Barja de Quiroga, Académico Correspondiente de la RANF, nos habló sobre el: *"El estrés oxidativo y longevidad"*, en cuya ponencia se resumió la relación entre los radicales libres de origen mitocondrial y la longevidad. Los antioxidantes endógenos se correlacionan de modo inverso con la longevidad máxima en las especies animales, y los experimentos que aumentan sus niveles a veces aumentan la supervivencia media pero no modifican la longevidad de la especie. En cambio, los datos disponibles indican que las especies longevas de mamíferos y aves tienen tasas bajas de producción mitocondrial de radicales libres en el complejo I y menor daño oxidativo en el ADN mitocondrial. Además, la restricción calórica, es la manipulación experimental mejor descrita que aumenta la longevidad, también disminuye la producción mitocondrial de radicales libres en el complejo I y mengua el conocido daño en el ADN mitocondrial. Esto no se debe a la restricción de carbohidratos ni a la de grasas, sino a la restricción proteica (isocalórica) y en particular a la restricción de metionina en la dieta. Recientemente, explicó que observaron que el primer fármaco que aumenta la longevidad de los mamíferos, fue la rapamicina, y que también disminuye la producción de radicales libres en el complejo I de la mitocondria. Así, todas las manipulaciones experimentales que aumentan la longevidad de los mamíferos disminuyen la producción mitocondrial de radicales libres derivados del oxígeno.

Otras actividades

El 27 octubre, tuvo lugar un acto de COFARES, considerado en el *Ciclo de Patologías Prevalentes*, con la conferencia titulada: *"Antiagregantes y anticoagulantes"*.

El 16 de noviembre se celebró de nuevo otra reunión entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la empresa de desarrollo en el ámbito farmacéutico Merck, Sharp & Dohme (MSD) con la Jornada sobre NUEVOS AVANCES EN LA TERAPIA ONCOLÓGICA: LA INMUNOTERAPIA. El Presidente de la RANF, D. Mariano Esteban Rodríguez moderó la Sesión científica coordinada por el Dr. D. Honorio C. Bando Casado. La Corporación hace hincapié en estrechar lazos con la industria farmacéutica y afín, para la realización y actualización de temas de gran actualidad y sensibilidad científica.

El 24 de noviembre tuvo lugar otro acto de COFARES, dentro de *Ciclo Patologías Prevalentes*, con la conferencia titulada *"Patologías prevalentes sobre la Hipertensión Arterial"*

Asimismo, el 24 de Noviembre tuvo lugar la presentación pública del Libro: *"Política y Evaluación de Medicamentos Hospitalarios"*, bajo la presidencia del Presidente de la RANF junto con el de la Fundación Gaspar Casal. Su objetivo fue encontrar el equilibrio entre el acceso a la innovación farmacológica y la garantía de sostenibilidad del Sistema Nacional de

Salud (SNS), que plantea varios interrogantes a los gestores sanitarios. Los Informes de Posicionamiento terapéutico (IPT), los Acuerdos de riesgo compartido, la gestión de la cronicidad o la evaluación fármaco-económica, son elementos que pueden contribuir a la eficiencia y sostenibilidad del SNS.

El 15 de diciembre tuvo lugar un tercer acto de COFARES, dentro de *Ciclo Patologías Prevalentes*, con la conferencia titulada “*Síndrome Metabólico*” que atrajo numeroso público y fue muy aplaudida.

El 11 de noviembre, y dentro de la Actividad de la Academia, tuvo lugar en la Sede de la RACEFyN, la Sesión Científica Conjunta de las Reales Academias de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; la Nacional de Medicina; y la Nacional de Farmacia, cuyo título fue “*Envejecer sin demencia*”, en la que actuaron como ponentes: Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras-Portugal, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia con el título: “*Procesos de neuroreparación y neuroprotección en las demencias seniles*”; el Excmo. Sr. D. Enrique Blázquez Fernández, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina: “*La resistencia a la acción de la insulina punto de encuentro entre la enfermedad de Alzheimer y la Diabetes tipo 2*”; y el Excmo. Sr. D. Jesús Ávila de Grado, Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales: “*La pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer*”.

Distinciones y de Académicos

En cuanto a los honores recibidos por nuestros Académicos, destacamos la toma de posesión del Excmo. Sr. D. Antonio L. Doadrio Villarejo, como Académico de Número, de la Real Academia de Doctores, en la Sección de Farmacia, Medalla 86, que tuvo lugar en la sede del Instituto de España. Su discurso de ingreso versó sobre el tema “*El universo, el sistema solar y los elementos químicos: un viaje cósmico*”.

Destacamos el trabajo que ha realizado nuestra Académica durante este último trimestre, la Excmo. Sra. Dña. María del Carmen Francés Causapé que ha publicado un excelente y entrañable trabajo sobre el Excmo. Sr. D. Rafael Folch Andreu, Académico de Honor que fue de esta Real Academia Nacional de Farmacia, con el título: “*El Profesor Rafael Folch Andreu: Aspectos de su ocupación docente, Sanitaria e hidrológica*”.

El pasado 17 de diciembre, la Junta General de la Real Academia Nacional de Farmacia eligió a la Excmo. Sra. Dña. Yolanda Barcina Angulo como nueva Académica de Número electa, Medalla 31. La Dra. Barcina Angulo es una eminente Catedrática de Nutrición y Bromatología de la Universidad Pública de Navarra, con un amplio curriculum vitae. Tiene una excelente cultura científica y humana, y ha destacado como una personalidad social y administrativa tanto en la Universidad española como en otras instituciones científicas y sociales de nuestro país. Tiene una destacada formación académica: es Licenciada en Farmacia por la Universidad de Navarra en 1982 con una media de sobresaliente. Su tesina fin de carrera recibió el Premio del Consejo General de Colegios de Farmacéuticos, por los trabajos de investigación del citado año, realizados en los laboratorios de la Facultad de Farmacia de Navarra. Doctora en Farmacia por la Universidad de Navarra en 1984. Tuvo como director y maestro a D. Jesús Larralde Berrio, Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia. Su tesis doctoral fue acreedora de Premio Extraordinario.

En su experiencia científica destaca que en 1986 obtuvo una plaza de Ayudante de Tecnología de Alimentos en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. En 1988 aprobó, por oposición, una plaza de Profesor Titular en la Universidad Autónoma de Barcelona, y en 1990 se trasladó a la Universidad del País Vasco, donde aprobó unas nuevas oposiciones de Profesor Titular en el Área de Nutrición y Bromatología, y fue Vice-decana de la Facultad de Farmacia de aquella Universidad. Posteriormente, en 1991, se incorporó al Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Pública de Navarra, del que fue su Directora, y en 1993 obtuvo la Cátedra de Nutrición y Bromatología en dicha Universidad. Desde 1995 hasta 1996 fue Vicerrectora de Gestión Académica de la Universidad Pública de Navarra. Y vocal de su Consejo Social desde 1996 hasta 2011.

Durante su trayectoria universitaria ha sido investigadora principal de programas científicos nacionales e internacionales, y ha dirigido más de una decena de tesis doctorales, cursos y seminarios diversos. Además, cuenta con varios libros publicados y más de cincuenta trabajos en revistas científicas nacionales e internacionales; y sus investigaciones científicas en 1996, ya contaban con el aval máximo de 2 sexenios de investigación. También ha formado parte de programas de control de calidad de distintos Consejos Reguladores, y ha sido miembro del Consejo Regulador del *Label Vasco de Calidad Alimentaria*, *Vicepresidenta de EUROPEL* (Entente Européenne pour l'Enseignement Laitier) y *comisionada por la FAO-CHIAM* para el desarrollo del sector lácteo de Albania. En febrero de 1995 fue elegida en Bruselas *Vicepresidenta de la Acción COST-95* (Cooperación Europea para la investigación Científica y Tecnológica).

Y en beneficio de nuestro país, España, debemos añadir su experiencia en su vida política en septiembre de 1996, cuando, en calidad de independiente, fue nombrada *Consejera de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Vivienda* del Gobierno de Navarra, a la sazón presidido por D. Miguel Sanz Sesma, de Unión del Pueblo Navarro. Con este nombramiento se convirtió en la primera mujer que ha formado parte del Gobierno de Navarra, en beneficio de la mencionada región española. Tras su experiencia en el Gobierno, fue designada por UPN para encabezar la candidatura al Ayuntamiento de Pamplona en las elecciones municipales de 1999, tras las cuales fue proclamada *Alcaldesa* de la ciudad, siendo también la primera mujer que accedió a este puesto. U tras las elecciones de junio de 2003 fue reelegida de nuevo Alcaldesa de Pamplona. De la misma manera, en las elecciones de mayo de 2007, volvió a ser nombrada por su excelente

gestión en beneficio de sus conciudadanos, Alcaldesa por tercera vez consecutiva.

Por otro lado, ha sido vocal de la *Comisión Ejecutiva de la Federación Española de Municipios y Provincias* y miembro de su Consejo Federal. También ha sido miembro de la Organización Ibero-Americana de Cooperación Intermunicipal O.I.C.I. y de la Organización de Ciudades y Gobiernos Locales Unidos IULA-FMCU. *El 19 de abril de 2009 fue elegida Presidenta de Unión del Pueblo Navarro*. Y el 1 de julio de 2011 fue investida *Presidenta del Gobierno de Navarra*, convirtiéndose por su excelente gestión y de nuevo en la primera mujer que ostenta este cargo. En noviembre de 2014 hizo pública de nuevo, su decisión de abandonar la política en beneficio de la ciencia. Y en julio de 2015 finalizó su mandato como Presidenta del Gobierno de Navarra y se incorporó a su Cátedra de la Universidad Pública de Navarra. En agosto del mismo año dejó de ser Presidenta de Unión del Pueblo Navarro. Como consecuencia del desempeño de sus responsabilidades políticas, ha formado parte de los órganos de gobierno de diversas instituciones y empresas.

Entre sus reconocimientos y distinciones debemos añadir que, en 2003 recibió la distinción a "*farmacéuticos con una trayectoria significativa*" que otorga el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Navarra. Fue nombrada "*Profesora Honoraria de la Universidad Técnica de Varna*" (Bulgaria) en abril de 2008; y *Profesora honoraria de la Universidad Nacional de Rosario* (Argentina) en diciembre de 2013. El 17 de septiembre de 2012 fue investida "*Doctora Honoris Causa*" por la Universidad San Ignacio de Loyola de Lima (Perú). El 21 de septiembre de 2015 recibió la propuesta del Ministro Federal de Relaciones Exteriores, distinguida por el Presidente Federal de Alemania, con la "*Cruz de Comendador de la Orden del Mérito de la República Federal de Alemania*" en reconocimiento por los méritos en favor de las relaciones hispano-alemanas.

El 17 de diciembre, también se eligió un nuevo Académico de Honor, el Excmo. Sr. D. Juan Carlos Izpisúa Belmonte, eminente y mundialmente conocido como Bioquímico e investigador, experto en biología del desarrollo, es profesor de investigación y ejerce la Cátedra Roger Guillemin, en el Laboratorio de Expresión Génica del Instituto Salk de California (EEUU). Nació en Hellín (Albacete), en 1960. Se licenció en Farmacia por la Universidad de Valencia y se doctoró en Bioquímica y Farmacia por las universidades de Bolonia (Italia) y Valencia. A continuación, completó su formación en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular, en Heidelberg (Alemania) y en la Universidad de California, en Los Ángeles (Estados Unidos). En 1993 se incorporó como profesor al Instituto Salk de San Diego (California, EEUU), donde luego pasó a dirigir uno de los equipos de investigación de más alto prestigio en el campo de la biología del desarrollo.

En el año 2000 recibió una oferta para regresar a España y dirigir el futuro Instituto de Biología del Desarrollo del Parque Científico de Barcelona (PCB), con cuyos responsables firmó un preacuerdo en octubre de ese año. Sin embargo, en septiembre de 2001 declinó la oferta del PCB y aceptó otra del Instituto Salk (USA), para dirigir un innovador y pionero programa de investigación con células madre embrionarias. Pues meses antes, en marzo de 2001, el eminente Dr. Izpisúa Belmonte y su equipo habían dado a conocer sus descubrimientos sobre el mecanismo genético básico que dispara el desarrollo de las extremidades y de algunos órganos en los vertebrados, e incluido el de los seres humanos. Un mecanismo que, por ejemplo, permite a las lagartijas regenerar extremidades amputadas o que hace posible que algunas salamandras como el ajolote mexicano regeneren partes o secciones de órganos como el corazón.

En ese ámbito, en noviembre de 2003, el Ministerio de Sanidad español le fichó como asesor para la puesta en marcha del Banco Nacional de Material Celular, dependiente del futuro Centro Nacional de Trasplantes y Medicina Regenerativa y encargado de coordinar los cultivos de células madre en España;. Seguidamente el Gobierno español firmó un convenio de colaboración con el Instituto Salk, de USA que, incluía, entre otros aspectos, la formación de científicos españoles en técnicas de investigación con células madre.

En 2004 colaboró con la puesta en marcha en el País Vasco de un laboratorio para investigar con células madre. Y seguidamente, en julio de ese año, el Presidente de la Generalitat de Cataluña, Pasqual Maragall, suscribió un acuerdo con la Ministra de Sanidad, Dña. Elena Salgado, para la constitución del Centro de Investigación de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB), y anunció el nombramiento del Prof. J.C. Izpisúa Belmonte como su Director. En marzo de 2005, colocó la primera piedra del CMRB, el Banco de Células Madre, que inició sus funciones bajo la dirección de la bióloga Anna Veiga. Una de las primeras líneas de investigación que abordó el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona fue la encaminada a convertir células madre embrionarias en células capaces de regenerar un corazón. Bajo su dirección, el CMRB ha investigado también la regeneración interna de órganos sistémicos, algo en lo que el Dr. J.C. Izpisua Belmonte lleva años trabajando en Estados Unidos. En ese contexto, en mayo de 2005, publicó un estudio, realizado con su equipo del Instituto Salk y basado en experimentos con peces cebra (*Brachydanio rerio*, de la familia *Cyprinidae*), que demuestra la relación de la vitamina A en la simetría exterior de los vertebrados. También en 2005, el Ministerio de Sanidad español autorizó un proyecto de investigación con células madre embrionarias dirigido por los doctores Juan Carlos Izpisúa y Anna Veiga y encaminado a la obtención de nuevas líneas celulares.

En 2009, científicos españoles dirigidos por él desarrollaron una nueva técnica para generar células madre embrionarias a partir de la piel de un individuo adulto y sin riesgo de incidencia de tumores. Ese mismo año también codirigió con otros tres científicos españoles una investigación que permitió convertir células de la piel de personas con *Anemia de Fanconi* en células embrionarias libres de esa enfermedad. En febrero de 2011, al frente de un grupo de científicos de EEUU y España, desarrolló un modelo de investigación sobre el envejecimiento humano tras rejuvenecer el núcleo de las células de enfermos

con un síndrome muy raro de envejecimiento precoz (el *Síndrome Hutchinson-Gilford*). En noviembre de 2013 investigadores del CMRB, del Salk Institute de California y del Hospital Clínic de Barcelona, lograron crear, por primera vez, mini-riñones humanos a partir de células madre, un trabajo que fue considerado uno de los diez hitos científicos de 2013 por la revista "Science".

El 13 de enero de 2014, presentó su dimisión como director del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB) para ubicarse con dedicación absoluta a su equipo de investigación en EE.UU, y fue sustituido en el cargo por el Dr. Ángel Raya. En su laboratorio del Instituto Salk, ha desarrollado una técnica pionera para "elaborar" órganos en animales. Lo ha conseguido en experimentos con ratas y ratones y lo continúa en cerdos, por una similitud genética con el ser humano. Su objetivo es generar órganos humanos (hígados, riñones, corazones,...) en el organismo de un cerdo, para ser trasplantados después a enfermos que los necesiten.

El Dr. Juan Carlos Izpisua Belmonte está considerado como uno de los científicos más relevantes a nivel mundial en biología del desarrollo y medicina regenerativa. Buena parte de sus investigaciones implican y versan sobre la regeneración natural de órganos y tejidos, y es reconocido internacionalmente como el descubridor del mecanismo (con fundamento en la vitamina A) que determina que, el exterior del cuerpo en los vertebrados sea simétrico y la distribución de los órganos internos, es asimétrica. Es autor de alrededor de 200 artículos científicos y ha sido galardonado por los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos con el premio Bill Clinton al mejor investigador en su campo, y por los Institutos Nacionales de Ciencia con el premio a la Creatividad Científica. En 2006 recibió la Medalla de Oro de Castilla-La Mancha.

Logros en medicina regenerativa: a finales de 2013, el equipo liderado por Juan Carlos Izpisua creó por primera vez miniriñones humanos, unas estructuras renales tridimensionales en cultivo a partir de células madre humanas. Se trata de un avance que puede facilitar el estudio de las enfermedades renales, descubrir nuevos fármacos y contribuir a la aplicación de terapias basadas en el uso de células madre. Hasta ese momento, los científicos habían tenido poco éxito en convertir células madre a células renales, un obstáculo que acabaron por salvar. Previamente el equipo del CMRB descubrió un nuevo método que facilita el proceso de obtención de células madre a partir de células adultas humanas y por primera vez consiguieron reemplazar un gen que se creía imposible de sustituir. Esta técnica tiene potencial para trasladarse a la práctica clínica. Según explicaba el propio centro, existen dos tipos de células madre pluripotentes: las células madre embrionarias, que son células inmaduras que nunca se han diferenciado a un tipo celular específico, y las células madre de pluripotencia inducida (iPS, de sus siglas en inglés), que son células adultas a las que se les ha reprogramado su reloj biológico para volver a un estado indiferenciado. Las células iPS ofrecen dos ventajas: se pueden crear a partir de células del mismo paciente y evitar así el rechazo inmunológico, y no implicar la destrucción de embriones sobrantes de tratamientos de fecundación in vitro. Hasta ese momento, las células iPS se producían con una fórmula muy estricta que no permitía ninguna variación, mecanismo que se puede modificar gracias al descubrimiento del equipo del Dr. Izpisua Belmonte.

Otras iniciativas: No obstante, los intentos por lograr órganos de laboratorio no han terminado. Uno de ellos es el que dirige la investigadora Doris Taylor, directora del departamento de Investigación en Medicina Regenerativa del Instituto del Corazón de Texas (EEUU), en colaboración con el Hospital Gregorio Marañón y la Organización Nacional de Trasplantes, con el que pretenden realizar órganos fuera del cuerpo. «Estamos a punto de publicar los resultados sobre este proyecto», señala Francisco Fernández-Avilés, uno de los principales investigadores españoles de esta investigación y jefe del Servicio de Cardiología del hospital madrileño. Este proyecto, que nació a finales de 2010 y que tuvo una duración de cuatro años, consistió en utilizar el esqueleto de órganos como el corazón, procedente de un donante cadáver al que le eliminan todas las células y se vuelve a repoblar con células madre adultas de un paciente. En su día, señaló que; «Nuestro trabajo es usar células madre de la médula ósea, de la grasa y del propio corazón para que sean éstas las que vistan de nuevo el corazón, un órgano muy complejo porque está formado por muchos tipos celulares como las musculares o cardiomiocitos (las más conocidas), las que forman los vasos, las responsables de los tejidos de conducción y las que dan soporte». A través de un biorreactor, una máquina que mantiene un determinado ambiente, simulan la situación del cuerpo humano, «hasta cierto punto, y siempre con imperfección». Cuando esté superada esta etapa, «habrá que ir a un modelo de animal grande, que seguramente será el cerdo, por afinidades sistémicas con el ser humano, para ver si realmente el órgano creado funciona al trasplantarlo».

El fin último de su equipo es lograr un "banco de órganos" o matrices, para estar disponibles para quien los necesite. Actualmente, en España hay 5.500 personas en lista de espera, de las que entre el 4% y el 6% muere antes de encontrar un donante, según cifras de la *Organización Nacional de Trasplantes*. Se estima que en el mundo un millón de personas podrían estar a la espera de un trasplante. Este equipo no es el único involucrado en la elaboración de órganos en el laboratorio. Uno de los principales impulsores de esta estrategia es Anthony Atala, del Instituto de Medicina Regenerativa de la Universidad Wake Forest (Winston-Salem, Estados Unidos), y que ha logrado desarrollar múltiples tejidos a través de diferentes estrategias, como el cultivo celular o el de las impresoras en 3D. De esta manera, han desarrollado vejigas, tráqueas, tejido para piel y riñones, aunque estos últimos no son funcionales. La dificultad de re-elaborar el ambiente del cuerpo humano por un lado o el ir más allá de estructuras sencillas, como las creadas por Atala, hace que otros grupos busquen soluciones alternativas para órganos complejos, como la mencionada de Izpisua o la que han puesto en marcha en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

El equipo que dirige Manuel Serrano, director del programa de Oncología molecular del CNIO, publicó hace unos meses

en “Nature” la que puede ser una opción futura a la creación de órganos en el laboratorio, señalando que: «Nosotros estamos ahora centrados en entender la regeneración celular usando los factores de reprogramación de Yamanaka directamente dentro del organismo. Es una incógnita, nadie sabe cuánto se podría mejorar la regeneración natural de los tejidos y órganos en mamíferos. Cuando se comprenda, se podrá manipular “in situ” y reactivar el proceso para favorecer la regeneración de órganos. Pero aún estamos lejos de eso» afirmó. Manuel Serrano considera que los avances inmediatos que proporcionarán la aplicación de la terapia celular en humanos vendrán de ensayos como el aprobado y realizados en Japón. «Algunos tipos de trasplantes celulares (con células creadas in vitro a partir de las técnicas de reprogramación) tendrán éxito, por ejemplo en el caso de la degeneración macular, o en enfermedades hepáticas donde el trasplante de células parece más efectivo».

Todo ello dentro del campo de la ética, y en cuanto a los posibles recelos éticos que podrían generarse con trabajos como el ideado por Juan Carlos Izpisua, el investigador del CNIO señala que, sin conocer a fondo este trabajo, «el intentar regenerar tejidos y órganos dentro de un cuerpo no me parece que plantee ningún problema ético. Hoy en día las células pluripotentes se obtienen de una manera que no conlleva ningún problema ético, pues no se usan óvulos ni se generan embriones». De la misma opinión es Carlos López Otín, Catedrático de Biología Molecular de la Universidad de Oviedo, que señala que, «si se transmite la información adecuadamente, la reprogramación celular no plantea ninguna barrera ética seria. Las formas de tratar se están sofisticando porque los problemas son complejos. Esta técnica no presenta tantas cuestiones éticas como podría tener por ejemplo la transferencia nuclear, más conocida por clonación terapéutica». Este investigador señala que junto con la reprogramación ideada por Yamanaka, la secuenciación completa de genomas del cáncer o de enfermedades hereditarias, en la que su grupo ha logrado descubrimientos muy destacables sobre leucemia y melanoma, constituyen los grandes avances en biomedicina de los últimos años. En cuanto a su aplicación clínica, «aunque todo va más lento de lo que nos parece, esta tecnología es eminentemente transformadora y avanzará rápidamente, ya que en la actualidad se empiezan a descubrir las causas genéticas de las enfermedades, y se pueden ofrecer consejos esperanzadores a los pacientes sobre posibles medidas preventivas».

Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario RANF



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA