

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



Volumen. 82, Número 1 - Enero - Marzo (2016)



New approaches to slow or reverse aging

Title in Spanish: *Nuevos enfoques para retrasar o revertir la vejez*

María Cascales Angosto¹

¹Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

ABSTRACT: The increase in life expectancy calculates that in 2050 the population over 80 years old will be over 400 millions, which will affect most of the countries in the world with enormous economic and social problems mainly due to the pathologies of aging. To solve these problems studies are in progress to slow or even reverse the senescent phenotype. Thus Audrey de Grey Strategies for Engineered Negligible Senescence (SENS) suggests seven main categories of damage whose reversal would constitute to defeat aging, while on the other hand, heterochronic parabiosis shows the systemic changes which leads to aging in order to fight them.

RESUMEN: El aumento de la esperanza de vida calcula que en 2050 la población de más de 80 años superará los 400 millones. Esto afectará a la mayoría de los países con enormes problemas económicos y sociales, debidos a los achaques propios del envejecimiento. Para paliar estos problemas están surgiendo estudios para retrasar o revertir el fenotipo senescente. Así, las estrategias de Audrey de Grey para la reducción artificial de la senescencia (SENS), proponen siete categorías de alteraciones que hay que superar para vencer la vejez, mientras que la parabiosis heterocrónica muestra los cambios sistémicos que conducen al envejecimiento para tratar de combatirlos.

Corresponding author: cascales1934@gmail.com

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

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 1 (2016), pp. 4-8

Language of Manuscript: Spanish

INTRODUCCIÓN

La vejez es un fenómeno inherente a los organismos vivos que se asocia normalmente con pérdidas graduales de la función y estructura celulares por acumulo de especies reactivas, daño al DNA, proteínas plegadas anormalmente, acortamiento de telómeros, etc. La vejez conlleva, a su vez, un deterioro progresivo de las funciones biológicas, capacidad de adaptación del individuo y un mayor riesgo de padecer enfermedades degenerativas. El considerable aumento de la esperanza de vida calcula que en 2050 la población de más de 80 años superará los 400 millones, lo que supondrá una "epidemia" que afectará a la mayoría de los países, al tener que soportar que una parte importante de la población se encuentre padeciendo una serie de enfermedades y achaques propios de la avanzada edad.

En base a estos razonamientos es comprensible que los investigadores se encuentren hoy centrando su interés en la búsqueda de los factores responsables del envejecimiento para estudiar las patologías más prevalentes y alarmantes que surgen como consecuencia de la pérdida de capacidad regenerativa de los tejidos y de patologías tales como: cardiopatías, arterosclerosis, diabetes, deterioro cognitivo además de la discapacidad y la fragilidad propias de la vejez.

Ante esta panorámica con sus enormes repercusiones económicas y sociales, están surgiendo numerosos estudios que tratan buscar cómo retrasar o incluso revertir los fenotipos negativos específicos del envejecimiento. En

la actualidad son muchos los grupos que se ocupan del rejuvenecimiento y cada día nos llegan nuevas experiencias que apoyan que la vejez es reversible, que es una enfermedad que se puede curar, que solo hay que profundizar en las causas del envejecimiento y combatirlas, etc.

ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN ARTIFICIAL DE LA SENESCENCIA (SENS)

Audrey de Grey ingeniero informático, apasionado de la inteligencia artificial, reconvertido a gerontólogo y biólogo mantiene que *Old People Are People Too: Why It Is Our Duty to Fight against Aging and Death?*. La forma en que concibe el envejecimiento es distinta a la idea general que tiene la sociedad. Según de Grey podemos escapar del envejecimiento utilizando tecnologías como la terapia celular y génica, así como con vacunas y fármacos, ya que para él el envejecimiento es una enfermedad.

En el libro con el que se ha granjeado fama mundial, *El fin del envejecimiento* (1), Aubrey de Grey habla de los siete "jinetes" del envejecimiento y de otras tantas estrategias para conseguir descabalgarlos. En su día predijo que a mediados de esta década estarían ya listos los primeros tratamientos. De Grey ha puesto mucho énfasis en el papel que desempeñan las mutaciones nucleares y mitocondriales en la aceleración del envejecimiento. Recalca también que el daño causado por la *basura molecular*, tanto en el interior como en el exterior de las células, está en la raíz de enfermedades

neurodegenerativas, tales como el Alzheimer. El envejecimiento celular causante de la senescencia inmunitaria y la diabetes de tipo 2, o la pérdida de elasticidad en las interconexiones celulares, está en el origen de la arteriosclerosis.

A través de la Fundación Matusalén, fundada por él, y también a través de *Strategies for Engineered Negligible Senescence* o Estrategias para la Reducción Artificial de la Senescencia (SENS), De Grey está intentado combatir en siete frentes:

1. **Mutaciones en los cromosomas.**
2. **Senescencia celular.**
3. **Mutaciones en el DNA mitocondrial.**
4. **Aglutinamiento de proteínas extracelulares.**
5. **Pérdida de células.**
6. **Agregados intracelulares.**
7. **Agregados extracelulares.**

De Grey se resiste a pensar que la vejez es un proceso natural e irreversible. Según palabras suyas "Creo que ha llegado el momento de desmitificar esa idea tan arraigada que nos ha impedido progresar. La vejez consiste básicamente en una serie de cambios en el metabolismo que conducen al deterioro progresivo de nuestro organismo. Pero esos daños se pueden reparar. Con un mejor mantenimiento de nuestro cuerpo, podremos permanecer saludables durante más tiempo. Igual que cuando a un coche le alargamos la vida cambiándole las piezas fundamentales". Ante la pregunta ¿Es acaso la vejez una enfermedad que se puede curar? De Grey responde "No es exactamente eso, pero sí podríamos decir que la vejez es una suma de enfermedades causadas por los problemas que provoca el paso del tiempo. En cualquier caso, es algo que se puede "tratar", con terapias mucho más efectivas y sofisticadas que las técnicas *anti-aging* que existen ahora. En el futuro, quizás pasemos por curas de rejuvenecimiento cada 10 años. Algunos tratamientos requerirán inyecciones, otras píldoras, otros incluso cirugía". De Grey estima que la ingeniería médica nos proporcionaría 30 años adicionales de vida y teniendo en cuenta la velocidad del progreso tecnológico, es probable que durante esos 30 años adicionales se produzcan avances que permitan reparar de nuevo los daños, prolongando aún más la esperanza de vida y así sucesivamente. Dependiendo del ritmo de innovación tecnológica se podría prolongar la esperanza de vida indefinidamente.

FACTORES CIRCULANTES QUE CAMBIAN CON LA EDAD. PARABIOSIS HETEROCRÓNICA

Otros grupos de investigadores están estudiando las consecuencias de la vejez utilizando el modelo experimental de parabiosis heterocrónica, procedimiento quirúrgico que consiste en la coexistencia física de dos seres vivos (que ocurre espontáneamente en los hermanos siameses), inducida quirúrgicamente en ratas o ratones de edad diferente (viejo y joven), que desarrollan una circulación sanguínea compartida y un intercambio rápido y continuo de células y factores sistémicos (2). Estos

experimentos han revelado que el intercambio sanguíneo entre ratón viejo y ratón joven es capaz de revertir en el ratón viejo los fenotipos asociados a la edad (3,4). Este es un modelo sumamente útil para determinar el efecto de la vejez sobre los factores que circulan en sangre y su influencia sobre tejidos específicos. Ante este hecho demostrado en ratas y ratones, los científicos se han preguntado: ¿qué es lo que tiene la sangre del animal joven? o ¿qué es lo que no debe tener la sangre del animal viejo?

Los estudios de Tomas Rando e Irina Conboy (5, 6) de la Universidad de Stanford han demostrado que la sangre del ratón joven puede rejuvenecer los músculos y el hígado de los ratones viejos. Es un hecho demostrado que la capacidad regeneradora de las células madre presentes en músculo y en otros tejidos decrece en la vejez y lo que el grupo de Rando ha demostrado ha sido que la sangre del ratón joven fue capaz de restaurar el potencial regenerativo inherente de las células madre del músculo e hígado del ratón viejo. Experimentos similares han investigado los efectos de la sangre joven sobre muchos otros órganos: cerebro, corazón y columna vertebral, con resultados similares. Es interesante destacar que en la parabiosis heterocrónica los efectos van en ambos sentidos, la sangre del ratón viejo causó un prematuro envejecimiento en tejidos del ratón joven.

Los científicos están ahora tratando de determinar cuáles son los factores presentes en la sangre joven que restauran la función de las células madre en ratón viejo. El grupo de Tony Wyss-Coray (7, 8), también de la Universidad de Stanford, ha determinado que el plasma sanguíneo es suficiente para restaurar la función tisular y han encontrado dos moléculas que decrecen con la edad, la GDF11 (*Growth Differentiation Factor 11*) (7) y la oxitocina (8). La administración mediante inyección de GDF11 o de oxitocina en ratón viejo produjo una activación en la función de las células madre. Existen probablemente muchos otros factores que contribuyen a la capacidad rejuvenecedora de la sangre del animal joven. El grupo de Conboy y Rando (5, 6) antes citado, ha observado que la disminución de la función regeneradora de las células madre no se debe al envejecimiento de ellas mismas sino a la alteración de la composición del microambiente que las rodea, sus nichos. También ha demostrado que el envejecimiento lleva consigo una elevación en las vías señalizadoras del factor transformante del crecimiento beta/Smad (TGF- β /Smad) en el nicho neurogénico del hipocampo, elevación análoga a la también demostrada en el nicho miogénico del músculo esquelético. Explorando la hipótesis de que la calibración juvenil de las vías señalizadoras puede recuperar la regeneración de muchos tejidos viejos, estos investigadores han encontrado que la atenuación sistémica de la señalización del TGF- β elevó tanto la neurogénesis como la regeneración muscular en el mismo ratón viejo. A nivel celular se ha establecido que una señalización más elevada del TGF- β en los nichos de las células madre en el hipocampo del ratón viejo implica a la microglia y provoca

la inflamación en cerebro, una vez comprobada la elevada expresión de la microglobulina $\beta 2$ (B2M), un componente de las moléculas MHC de clase I (5, 6).

Por tanto, las células madre adultas persisten en el organismo viejo, pero el declinar inexorable de su capacidad regeneradora con el transcurso del tiempo, es lo que ocasiona una incapacidad de los tejidos y órganos para mantener la homeostasis y reparar los daños. Sin embargo las evidencias sostienen que la capacidad intrínseca regeneradora de las células madre no declina con la edad, lo que ocurre es que son los cambios en el microambiente o “nichos” los que contribuyen a disminuir el potencial regenerativo de dichas células y a envejecer el tejido. Estos cambios en los nichos que inhiben la función de las células madre se han observado en músculo esquelético, cerebro, piel, sangre y hueso de animales viejos. Si se considera que las vías señalizadoras morfogenéticas, Notch, Wnt, TGF- β , FGF, Shh, IGF, IL-6 y otras, son las que regulan el comportamiento de las células madre en los diferentes tejidos, es posible que los cambios asociados a la edad en estas vías estén también conservados en los múltiples órganos y sistemas. Varios estudios han demostrado que estos cambios asociados a la vejez no se deben a una sola vía señalizadora, sino a una red de vías altamente interactivas, como las anteriormente citadas. Por ejemplo, el incremento dependiente de la edad de la señalización del TGF- $\beta 1$ contribuye al exceso de IL-6 u otras citoquinas inflamatorias tales como IL-17, y que la atenuación experimental del TGF- $\beta 1$ puede dar como resultado una disminución de las citoquinas inflamatorias y normalizar los niveles de las proteínas MHC I. El diálogo complejo entre los cambios sistémicos y locales en los factores de señalización específicos dependientes de la edad se ha demostrado que es el que inhibe la regeneración tisular mediada por las células madre.

INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DEL SISTEMA TGF-B1/PSMAD Y REJUVENECIMIENTO

Recientes publicaciones de Yousef et al., (9) han puesto de manifiesto el rejuvenecimiento de la miogénesis y la neurogénesis en ratones viejos al revertir la señalización de la citoquina pro-fibrótica TGF- $\beta 1$, hacia los bajos niveles encontrados en ratones jóvenes. Cuando este sistema de señalización se eleva, se inhibe la capacidad proliferativa de las células madre del músculo y del hipocampo, necesaria para la restauración del tejido diferenciado. La atenuación de este sistema de señalización se ha conseguido por acción de una simple molécula, aplicada a ratones viejos vía sistémica, la SB-431542 (un inhibidor de la quinasa del receptor ALK5). Estos resultados, visibles en los ratones por la recuperación de mayor agilidad y movimiento, memoria e independencia, presentan una significativa actividad terapéutica que puede constituir un hito en el tratamiento de la vejez en humanos.

Nos encontramos en un momento crítico en el que resulta necesario buscar remedios sencillos, fáciles de administrar y económicos que puedan resolver el problema

del incesante incremento de la población senil que ya padece la sociedad. Ante los descubrimientos anteriormente mencionados, los científicos han decidido echar la vista atrás tratando de encontrar estos remedios mediante el reconocimiento de la medicina tradicional, tanto china, como ayurvédica e incluso occidental, que incluye plantas, cuyas hojas y raíces se sabe que poseen acciones farmacológicas conocidas desde la antigüedad. Tomando como base estos conocimientos antiguos, recientes experimentos han comprobado que una serie de estas sustancias clásicas de procedencia vegetal, reversion la señalización del sistema TGF- $\beta 1$ /pSmad en animales de experimentación y en poblaciones humanas, y con ello favorecen el funcionamiento de las células madre lo que reporta una regeneración de los tejidos y un rejuvenecimiento del organismo (10).

A continuación mostramos algunos ejemplos cuya actividad se ha demostrado recientemente:

Gotu kola o Centella asiática, es una hierba nativa de la India y Sri Lanka. Desempeña un papel clave en la medicina tradicional ayurvédica como tratamiento de una gran variedad de patologías. La reputación de gotu kola es casi mítica en lo que a alargar la vida se refiere y ha ganado su lugar en la medicina alternativa moderna al ser examinadas sus propiedades en una serie de estudios clínicos. Gotu Kola tiene importantes usos farmacológicos debido a su capacidad para aliviar la inflamación y mejorar la circulación. Las hojas de gotu kola se han utilizado en la medicina clásica para promover la rápida cicatrización de las heridas, para mitigar las patologías fibróticas (cirrosis y queloides), y de degeneración neurológica, entre los que se incluye la senilidad. Recientes estudios biomédicos en sistemas experimentales, indican que el *ácido asiático* y otros constituyentes, presente en estas hojas, bloquean la señalización TGF-beta/Smad y producen notables mejoras en enfermedades tales como la fibrosis hepática producida por administración de tetracloruro de carbono a ratas, la miopatía cardíaca producida por elevada presión sanguínea en ratón, la fibrosis pulmonar inducida en ratas por bleomicina, la generación de queloides en cultivo celular, la fibrosis tubulointersticial renal producida por obstrucción de un uréter en ratón, la curación de heridas producidas por quemados en ratón, la fibrilación atrial en ratón, etc. (11).

Brahmi (*Bacopa monniera*), usada sola o en combinación con gotu kola tiene un amplio uso en la India desde la antigüedad, para mantener el estado cognitivo en ancianos, como también para tratar el síndrome de colon irritable (11).

Huan qí o raíz de astrágalo del *Astragalus propinquus*, es una fanerógama perteneciente a la familia Fabáceas. Es una de las 50 hierbas fundamentales de la medicina tradicional china y es la primera planta que se considera que estimula el sistema inmune. Se usa para detener los resfriados y la gripe de invierno y contra la diabetes. Al igual que la gotu kola, experimentos recientes en animales tratados con raíz de astrágalo, han demostrado

una atenuación del sistema señalizador TGF- β 1/Smad, que va unida a una reducida fibrosis (12).

Raíz de Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) denominada “salvia roja” por el color de sus raíces, es uno de los pilares de la medicina china que se ha utilizado desde tiempos antiguos para mantener la salud del sistema circulatorio. Es capaz de reducir la glucemia y prevenir la formación de productos terminales de glicosilación avanzada (AGE), que se asocian con elevados riesgos del declinar cognitivo asociado al envejecimiento. Es un moderno tratamiento chino para la pancreatitis aguda. También atenúa la señalización del TGF- β 1/Smad y reduce la fibrosis en modelos experimentales. Uno de los principales componentes hidrosolubles de esta raíz es el ácido salvianólico b (13), compuesto fenólico cuya actividad farmacológica promueve la proliferación y diferenciación de las células madre.

El rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa*), denominado turmerico en otros idiomas, tiene un amplio uso en las culturas ayurvédica, china y occidental, donde se utiliza como pigmento amarillo para dar color a los alimentos. La curcumina, el principio activo de la cúrcuma, puede que sea el inhibidor más potente conocido del sistema señalizador TGF- β 1/pSmad, demostrado en un modelo experimental (14). En una muestra de un paciente, redujo los niveles de la nefropatía diabética al rebajar la concentración de proteinil urea y mejorar la función hepática.

La raíz de zarzaparrilla (*Smilax glabra*) se ha utilizado desde la antigüedad para reforzar huesos y músculos y para tratar estados de infección. Entre otros usos se incluye el de sazonzador renombrado por su sabor agradable. Un estudio experimental reciente ha comprobado que los extractos de la raíz de zarzaparrilla inhibieron la señalización TGF- β 1/Smad, y con ello la migración de las células cancerosas (15).

Esta no es una lista completa de plantas que poseen propiedades medicinales características que han sido utilizados en la medicina tradicional y son capaces de revertir la intensidad de la señalización del sistema profibrótico TGF- β 1/pSmad, en animales y en humanos. Es un ejemplo que muestra las propiedades farmacológicas de sustancias seguras y eficaces utilizadas desde tiempos antiguos, con una gran aceptabilidad en humanos y de fácil disponibilidad. Tomando en consideración esta información, se llega a la conclusión que estas plantas deben estar disponibles y ser incluidas en las dietas de adultos para modular la señalización TGF- β 1/pSmad. Estas y otras materias tradicionales han de ser investigadas para incluirlas como terapias modernas por su capacidad para restaurar la función de las células madre.

CONCLUSIONES.

La sangre es mucho más que un líquido transportador de gases y nutrientes. La sangre encierra enormes cantidades de factores circulantes que por su efecto sobre los tejidos, puede modificar el funcionamiento de los sistemas cardiovascular, nervioso, muscular esquelético y

ciertas funciones cognitivas cerebrales, entre otros aspectos esenciales de la vida y salud del ser humano.

Los estudios de parabiosis heterocrónica están permitiendo detectar e identificar los cambios o alteraciones que experimentan estos factores por efecto de la vejez, así como la secuencia de eventos moleculares que estos cambios traen consigo a nivel celular y tisular. Los datos obtenidos hasta la fecha combinados con los métodos más actuales de biología molecular pueden contribuir a llenar el vacío de conocimiento referente al problema de la vejez. Esto permitiría profundizar en los mecanismos celulares y moleculares, con el objeto de promover un rejuvenecimiento o un retraso en la aparición de los achaques propios de la edad. Además, este tipo de estudios ha de poder en el futuro mejorar la calidad de vida de una gran parte de la población que por su edad padecen cardiomiopatías, trastornos neuromusculares o de composición corporal y cognitivos. Finalmente, es obvio que estos descubrimientos pueden ser objeto de futuras manipulaciones terapéuticas, utilizando la acción farmacológica de las numerosas sustancias asequibles y seguras que nos ofrece la naturaleza. Estas sustancias pueden jugar un extraordinario papel en el rejuvenecimiento y bienestar de la población por su facilidad de administración incluso como aditivos en la alimentación. En nuestras manos está asumir todos estos desafíos.

REFERENCIAS

1. De Grey A, Rae M. Ending Aging: The Rejuvenation Breakthroughs that Could Reverse Human Aging in Our Lifetime. New York: Saint Martin's Press 2007.
2. Scudellari M. Ageing research. Blood to blood. Nature, 2015; 517: 426-9.
3. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. Science 2014; 344: 630-4.
4. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. Nature Medicine 2014; 20: 659-63.
5. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. Nature 2005; 433: 760-4.
6. Conboy IM y Rando TA. Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. Cell cycle 2012; 11: 2260 -7.
7. Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. Cell 2013; 153: 828-39.
8. Elabd C, Cousin W, Upadhyayula P, et al. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. Nature Commun 2014; 5: 4082.

9. Yousef H, Conboy MJ, Morgenthaler A et al. (2015) Systemic attenuation of the TGF- β pathway by a single drug simultaneously rejuvenates hippocampal neurogenesis and myogenesis in the same old mammal. *Oncotarget* 2015; 6: 11959-78.
10. Corder EH y Khalsa KPS. Rejuvenation by inhibiting TGF- β 1/pSmad signaling. *Oncotarget* 2015; 19: 16970.
11. Tang L, He R, Yang H et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. *PLoS One* 2012; 7: e31350.
12. He S, Yang Y, Liu X, et al . (2012) Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits cell proliferation, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblasts by mediating transforming growth factor- β /Smad pathway. *Br J Dermatol.* 166, 564-574.
13. Zhang M, Cao SR, Zhang R et al. The inhibitory effect of salvianolic acid B on TGF- β 1-induced proliferation and differentiation in lung fibroblasts. *Exp Lung Res* 2014; 40: 172-85.
14. Khajehdehi P, Pakfetrat M, Javidnia K, et al. Oral supplementation of turmeric attenuates proteinuria, transforming growth factor- β and interleukin-8 levels in patients with overt type 2 diabetic nephropathy: a randomized, double-blind and placebo-controlled study. *Scand J Urol Nephrol* 2011; 45: 365-70.
15. She T, Zhao C, Feng J et al. Sarsaparilla (*Smilax Glabra* Rhizome) extract inhibits migration and invasion of cancer cells by suppressing TGF- β 1 pathway. *PLoS One* 2015; 5: 10:e0118287.



Enrichment-improvement in the effectiveness of the implementation of the polymerase chain reaction of pathogens in food

Title in Spanish: *Enriquecimiento-mejora en la eficacia de la realización de la reacción en cadena de la polimerasa de patógenos en alimentos*

J. Cuadrado^{1*}, C. Cuadrado², B. Cuadrado³

¹Laboratorio de Salud Pública de Jaén. Junta de Andalucía. Paseo de la Estación 21, 1ª Planta, 23008, Jaén, España.

²Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas 23009, Jaén, España. ³Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja 18071, Granada, España.

ABSTRACT: Objective. Improve the effectiveness of the tests by qualitative polymerase chain reaction (PCR) of pathogens in food. When performing a enrichment consists in making a lower dilution to the 1/10 is intends to bring forward in time, reduce the cost of media, it seeks to enable the complete up to 100% of the samples to perform in a PCR and does not decrease the load cell Diana of the food. Methods. Investigation of the presence or absence of a pathogenic bacterium in food and its concentration per millilitre of dissolution, following the traditional method in different dilutions, in two different types of food. Results. The results obtained in the experiment with a pathogen in food, evidence that using dilutions lower than 1/10, the bacterial concentration for a minimum number of hours of incubation anticipates the detection by PCR of deoxyribonucleic acid (DNA) target, with values of cfu/ml above 1×10^3 . Therefore the incubation time in an enrichment broth and the volumes of the solutions are reduced. And it is only needed one operator and one incubator for all tasks. Conclusions. The efficacy increases because are needed less material and working hours. Testing more samples in the same working day (makes possible to perform all samples that supports the thermal cyler for each start-up) the analysis time decreases in seven hours at least.

RESUMEN: Objetivo. Mejorar la eficacia de los ensayos cualitativos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de patógenos en alimentos. Al realizar un enriquecimiento consistente en hacer una dilución inferior a la 1/10 se pretende adelantar en tiempo, reducir el gasto de medios, se procura posibilitar el completar hasta el 100% las muestras a realizar en una PCR y no disminuir la carga celular diana del alimento. Métodos. Investigación de la presencia o ausencia de una bacteria patógena en un alimento y su concentración por mililitro de disolución, siguiendo el método tradicional a distintas diluciones, en dos matrices. Resultados. Los resultados obtenidos en el experimento con un patógeno en alimentos, evidencia que con diluciones inferiores a 1/10, la concentración bacteriana para un mínimo de horas de incubación adelanta la detección por PCR del ácido desoxirribonucleico (ADN) diana, con valores de ufc/ml por encima de 1×10^3 . Por tanto el tiempo de incubación en un caldo de enriquecimiento se acorta, así como los volúmenes de las disoluciones a incubar. Y de este modo solo es necesario un operario y una estufa de incubación para realizar todas las tareas. Conclusiones. Mayor eficacia al necesitarse menos medios materiales y horas de trabajo. Realización de mayor número de muestras en una misma jornada de trabajo (se posibilita realizar el total de muestras que admite el termociclador por cada puesta en funcionamiento), se acorta el tiempo de análisis en siete horas como mínimo.

*Corresponding Author: jose.cuadrado@juntadeandalucia.es

Received: January 6, 2015 Accepted: January 25, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 1 (2016), pp. 9-13

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la técnica por PCR, cada vez son más numerosos los técnicos y/o gerentes que implantan dichos métodos en sus laboratorios, (demostrado por el aumento de participaciones en ensayos intercomparativos con estas técnicas y en el número de artículos que desarrollan esta metodología). Una de las principales ventajas de las técnicas moleculares es la reducción del tiempo de análisis, pudiendo ser de días en algunas determinaciones, por ejemplo, con un método tradicional de investigación de *Listeria monocytogenes* según UNE EN ISO 11290-1:1997/A1: 2005, la duración del ensayo

sería de cuatro días para una muestra con presencia y siete días para una con ausencia (en el mejor de los casos para ambas), con la técnica PCR para la misma determinación, el tiempo no excedería de dos días (1).

A la hora de realizar un ensayo de PCR para la determinación de patógenos en alimentos suele estar indicado el enriquecimiento de la muestra (2,5).

¿Qué importancia tiene en una investigación (por ejemplo para la determinación de *Salmonella spp*), la cantidad exacta de diluyente añadido (225 ml de agua de peptona tamponada (BPW) para 25 g de muestra) a la hora de detectar todas las posibles bacterias diana existentes en

la porción de muestra? ¿Podríamos añadir una cantidad mayor o menor de diluyente, con la posibilidad de abaratar costes y procesar mayor número de muestras en el menor tiempo posible?

¿Cuántas unidades formadoras de colonias (ufc) teóricas de la bacteria diana detectaríamos en el aislamiento final en placa? ¿Disminuye la eficacia detectora de patógenos en alimentos mediante la técnica por PCR, si no se realiza enriquecimiento de la muestra? ¿Disminuye igualmente la detección si se realiza enriquecimiento según indican los procedimientos de investigación tradicionales en base a normas internacionales de estandarización? ¿Disminuye igualmente la detección si se realiza enriquecimiento con alguna modificación en cuanto a dilución, tiempo de incubación para las determinaciones de investigación? Partiendo de un alimento, como puede ser una muestra de carne fresca de porcino de 25 g, consideramos que si ésta, tuviese una bacteria de *Salmonella* en esos 25 g, con la posible flora acompañante, los nutrientes de la muestra, serían suficientes para la reproducción de los microorganismos presentes, sin embargo, en caso de que la flora acompañante competitiva existiese de manera sobre abundante, podría llevarnos a pensar que su supervivencia estaría comprometida, por lo cual, añadimos nutrientes en abundancia y condiciones favorables para su reproducción, ¿cuáles? En la fase de enriquecimiento para la determinación de *Salmonella spp* se adiciona habitualmente, agua de peptona tamponada que aporta además de proteínas, cloruro de sodio, hidrógeno fosfato disódico dodecahidratado y dihidrógeno fosfato de potasio. Esta etapa se da a temperatura óptima 37 ± 1 °C y tiempo adecuado de 16 a 20 horas (3). Los cálculos realizados para obtener la concentración bacteriana (tabla 2) parten del tiempo de generación para *Salmonella typhimurium* en un medio con aminoácidos y sales (agua de peptona tamponada), considerando así la tasa de crecimiento de *Salmonella* de 20-30 minutos (4,5).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material y aparatos

- Balanza o delta dilutor.
- Probetas de vidrio de 100-250 mL.
- Pipetas estériles de 1 mL.
- Homoginizador (stomacher).
- Asas de cultivo estériles.
- Mechero de gas.
- Bolsas de stomacher estériles con filtro y soporte para incubar.
- Tijeras, pinzas, bisturí, hojas, cucharilla u otro material similar para manipular las muestras.
- Estufas de cultivo calibradas a las temperaturas de incubación que corresponda.

2.2. Reactivos y medios de cultivo

- Agua de peptona tamponada.

-Caldo de enriquecimiento Muller-Kauffmann tetratiónato-novobiocina y Rappaport-Vassiliadis con soja.

-Medio de aislamiento selectivo diferencial, XLD y otro apropiado para aislar *Salmonella spp*.

-Sistema de identificación bioquímica y antiseros específicos.

2.3. Planteamiento

En las normas internacionales de estandarización (6) se contempla la posibilidad de enriquecer la muestra en un medio nutritivo para favorecer el crecimiento de los microorganismos diana. Es frecuente el enriquecimiento con caldo a la temperatura adecuada a cada microorganismo, durante 24 horas (7,8,9,10,11,12) en los ensayos de PCR para detectar bacterias patógenas en los alimentos. Realizar enriquecimientos 24 horas a 30, 35, 37 °C según métodos tradicionales de investigación por la International Organization for Standards (ISO) para realizar ensayos mediante PCR conlleva:

Un día más en la finalización del análisis.

225 ml de caldo por muestra.

Procesamiento de 10 a 20 bolsas de stomacher como máximo (250 ml por muestra) por estufa de cultivo (de unos 50 litros de capacidad).

Necesidad de cinco o más estufas de 50 litros, para obtener un 100% de rendimiento en los ensayo de PCR, ya que estos pueden procesar noventa y seis muestras por análisis(13).

-No es obligatorio pero sí adecuado enriquecer la muestra (5).

-Si se disminuyese el volumen de solvente, se podrían procesar más muestras en menos tiempo y con menos requerimientos físicos (reactivos, materiales, equipos, tiempo, personal).

-La preparación de noventa y seis muestras para la PCR (14,13) y el análisis mediante esta técnica conlleva no más de dos horas y treinta minutos (15).

2.4. Experimento

Con estos acontecimientos, se realiza un experimento consistente en ver si la carga de microorganismos diana es mayor de 10^3 /ml de una solución cuyo volumen no sea superior a 100 ml e inferior a 50 ml y en la que esté presente el alimento a razón de 25 g, homogeneizado y disuelto en caldo de enriquecimiento apropiado, no superando los volúmenes indicados. Se utilizan dos matrices, una sólida y otra líquida, se realiza un ensayo para cada matriz con el fin de ver que la muestra natural no tenga contaminación del patógeno diana, se realizan en ambas matrices ensayos repetidos a distintas diluciones y contaminando la muestra con lenticulas de la national collection of types culteres (NCTC) certificadas y a la concentración más baja posible detectada en el laboratorio.

2.5. Procedimiento operativo de análisis

Realizar cada uno de los ensayos como se relacionan siguiendo la ISO 6579:2003 (ver Tabla 1).

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, utilizando BPW como medio de enriquecimiento con el fin de conocer si la muestra natural está contaminada o no.

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, sin añadir BPW, dopada con 4 ufc de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023 /25ml (Límite de detección (LD) del método en el laboratorio) y realizando tres determinaciones iguales.

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, tras añadir a la muestra 225 ml de BPW, con el mismo dopaje y solo en una unidad de muestra.

-Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en 25 ml de leche de lactantes, tras añadir a la muestra 75 ml de BPW, con el mismo dopaje y en dos unidades.

-Determinación de *Salmonella spp* en una muestra natural de 25 g de paté de cerdo, para ver si la muestra está

o no contaminada.

-Determinación de *Salmonella spp* en una muestra de paté de cerdo (25g) dopada con 4 ufc/25 g de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023, con 225 ml de BPW.

-Determinación de *Salmonella spp* en una muestra de paté de cerdo (25g) dopada con 4 ufc/25 g de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023 (LD del método en el laboratorio), con 50 ml de BPW y por triplicado.

2.6. Obtención de datos y conclusiones

Los ensayos los realiza un analista distinto al que dopa. En todas las placas sembradas de las muestras dopadas, el crecimiento de colonias sospechosas de *Salmonella spp* ha sido abundante.- Determinación de *Salmonella spp* en una muestra de paté de cerdo (25g) dopada con 4 ufc/25 g de *Salmonella typhimurium* NCTC 12023, con 75 ml de BPW y por duplicado.

Tabla 1. Alimentos dopados a distintas diluciones.

Matriz	Peso en g	Enriquecimiento con BPW en ml	Nº ensayos	Dopaje en Ufc/25 g	Resultado
Leche deshidratada lactantes	25	225	1	0	Ausencia
		225	1	4	Presencia
		0	3	4	3 Presencias
		75	2	4	2 Presencias
Paté de cerdo	25	225	1	0	Ausencia
		225	1	4	Presencia
		50	3	4	3 Presencias
		75	2	4	2 Presencias

Como se ve en la Tabla 1, las muestras naturales sin dopar resultaron negativas a *Salmonella spp*, y en el resto (las dopadas) se dio la presencia de *Salmonella spp*, apareciendo así en todas las muestras menos diluidas. Si se realiza el cálculo del número teórico de células del

patógeno diana en un mililitro de caldo para a partir de ahí realizar la extracción del ADN, considerando la tasa de crecimiento de *Salmonella spp* de 2 (60/30) (4) podemos establecer la Tabla 2 (16):

Tabla 2. Concentración de células diana por ml de disolución a distintas diluciones.

Minutos	Horas	Número células/muestra	log	Células diana (<i>Salmonella spp</i>) /ml de la dilución 1/4 procedente de 25g-ml de alimento	Células diana (<i>Salmonella spp</i>) /ml de la dilución 1/3 procedente de 25g-ml de alimento
0	0	1	0	Menos de 10	Menos de 10
30	0,5	2	0,3	Menos de 10	Menos de 10
60	1	4	0,6	Menos de 10	Menos de 10
90	1,5	8	0,9	Menos de 10	Menos de 10
120	2	16	1,2	Menos de 10	Menos de 10
180	3	64	1,8	Menos de 10	Menos de 10
240	4	256	2,4	Menos de 10	Menos de 10
300	5	1024	3,01	Menos de 10 ²	Menos de 10 ²
360	6	4096	3,61	Menos de 10 ²	Menos de 10 ²
420	7	16384	4,21	Menos de 10 ³	Menos de 10 ³
480	8	65536	4,81	Menos de 10 ³	Menos de 10 ³
540	9	262144	5,41	2,6x10 ³	3,4x10 ³
600	10	1048576	6,02	1x10 ⁴	1,3x10 ⁴
660	11	4194304	6,62	4,1x10 ⁴	5,5x10 ⁴
720	12	16777216	7,22	1,6x10 ⁵	2,2x10 ⁵
840	14	268435456	8,42	2,6x10 ⁶	3,5x10 ⁶
960	16	4,3x10 ⁹	9,63	4,3x10 ⁷	5,7x10 ⁷

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

Los resultados obtenidos en el experimento evidencian que para alimentos como la leche y el paté diluidos a 1/3 y 1/4, la concentración bacteriana para un mínimo de 9 horas de incubación facilita la detección por PCR del ADN diana, con valores de ufc/ml superiores a 1x10³.

Las muestras analizadas con dilución 1/10, propia de los métodos tradicionales de investigación, han tenido similares resultados.

3.2. Discusión.

El realizar una dilución inferior a 1/10 no contradice la ISO 22174 ya que el fin de incrementar el número de células del patógeno se cumple y permite la detección de un número bajo de microorganismos diana al incrementar estos con el enriquecimiento.

4. CONCLUSIONES

Esta sencilla labor conlleva repercusiones como:

- Menor consumo de reactivos (caldos de enriquecimiento).
- Menos horas de incubación.

-Adelanto en tiempo de los resultados analíticos.

-Menores necesidades de equipos (incubadores) y fungibles (por ejemplo bolsas de stomacher más pequeñas).

-Procesamiento de noventa y seis muestras por termociclado.

-Actuación de un único analista.

Otro tipo de experimentos se podrían realizar en base a conseguir determinadas mejoras distintas o mayores a las aquí descritas, como barajar el disminuir el tiempo de incubación sin que los resultados se vean afectados, u organizar la secuencia de trabajo para que con pequeños cambios como el de bajar la dilución se consiga mayor eficacia analítica

5. REFERENCIAS

- Gattuso A et al. Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. Int J Food Microbiol. 2014 Aug 1;184:106-8.
- Margie D. Lee1, Amanda Fairchild1. PCR Methods in Foods. Editors: John Maurer. 2006 Chapters 3 Sample Preparation for PCR.

3. UNE EN ISO 6579:2003 Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
4. John. L. Ingraham, Catherine A. Ingraham. Introducción a la Microbiología Tomo I Ed Reverté S.A. 2004.
5. Zinsser H, Wolfgangk K et al. Microbiología. Editorial Médica Panamericana. 1995.
6. UNE EN ISO 22174:2005 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones.
7. Sails AD et al. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Mar;69(3):1383-90.
8. Bohaychuk VM et al. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J Food Prot.* 2007 May;70(5):1080-7.
9. M. Radhika, Majumder Saugata, H.S. Murali, and H.V. Batra. A novel multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella enterica* and *Shigella* species. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(2): 667–676. Published online 2014 Aug 29. PMID: PMC4166298.
10. Kamil M. AL-Jobori and Ali K. AL-Bakri Kamil M. AL-Jobori and Ali K. AL-Bakri. Comparison between PCR and Culture Methods for Detection of *Salmonella typhimurium* from Food and Beverage. *Donnish Journal of Food Science and Technology Vol 1(2)* pp. 006-016 August, 2015.
11. Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., and Comi, G. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 103(2):167–78. 2005.
12. Hiroshi Fukushima, Kazunori Katsube, Yukiko Hata, Ryoko Kishi, and Satomi Fujiwara. Rapid Separation and Concentration of Food-Borne Pathogens in Food Samples Prior to Quantification by Viable-Cell Counting and Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan; 73(1): 92–100. Published online 2006 Oct 20. doi: 10.1128/AEM.01772-06 PMID: PMC179711413- David Rodríguez Lázaro. Development of molecular-based techniques for the detection, identification and quantification of food-borne pathogens. 2004.ISBN: 84-688-8617-3 tabla I.5
14. Josefsen, Mathilde Hartmann. Molecular detection of foodborne pathogens. 2009. Frederiksberg: Samfundslitteratur.
15. C. Longhi, A. Maffeo, M. Penta, G. Petrone, L. Seganti and M.P. Conte. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 94, 879–885
16. Thomas D. Brock, Michael T. Madigan. Microbiología. Prentice Hall. 1993.



Coronary ischemia-reperfusion: role of nitric oxide and endothelin-1. A Review

Title in Spanish: *Ischemia-reperfusión coronaria: papel del óxido nitro y endothelina-1. Una Revisión*

Godofredo Diéguez Castrillo^{1,*}

¹ Catedrático de Fisiología Emérito, Facultad de Medicina, Universidad CEU-San Pablo, Madrid, España

ABSTRACT: This Review focus on the myocardial ischemia-reperfusion, paying particular attention to the role of nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) in the regulation of the coronary circulation under normal conditions and after ischemia-reperfusion. Coronary atherosclerosis is usually induced by endothelium dysfunction/damage, and is the main cause of acute coronary syndromes (e. g., acute myocardial infarction, AMI). The assessment of endothelial function of patients with coronary artery disease may provide useful information. The most effective treatment of AMI is timely reperfusion for restoring the blood flow to the ischemic myocardial territory, but this procedure may also damage myocardium (reperfusion injury), of which the pathophysiology and treatment remain uncertain. The interaction between NO and ET-1 may be relevant for regulating the coronary circulation, with predominance of NO over ET-1 under normal conditions. The coronary circulation plays a crucial role in ischemia-reperfusion since it is the cause and victim of consequences of this condition. Ischemia-reperfusion damages not only the myocardium but also coronary vasculature, including the endothelium, increases plasma levels of ET-1, induces functional predominance of ET-1 over NO, augments the coronary response to ET-1, and alters the role of endothelin receptors in this response. All these alterations may lead to dysregulation of coronary vasculature and the non-reflow phenomenon, which may underly reperfusion injury. Thus, ET-1 could be of significance in pathophysiology of ischemia-reperfusion and reperfusion injury, and the use of antagonists for endothelin ETA/ETB receptors could protect the heart against reperfusion injury.

RESUMEN: Esta Revisión se centra en la isquemia-reperfusión del miocardio, prestando particular atención al papel del óxido nítrico (NO) y endothelina-1 (ET-1) en la regulación de la circulación coronaria en condiciones normales y tras la isquemia-reperfusión. La aterosclerosis coronaria suele estar causada por disfunción/daño endotelial, y lidera las causas de los síndromes coronarios agudos (p. e., infarto agudo de miocardio, IAM). El tratamiento más eficaz del IAM es la perfusión del territorio de miocardio isquémico, pero este procedimiento también causa lesión del miocardio (lesión por perfusión), cuya fisiopatología y tratamiento siguen siendo inciertos. La interacción entre el NO y ET-1 es relevante en la regulación de la circulación coronaria, y en condiciones normales predomina el NO sobre la ET-1. La circulación coronaria desempeña un papel crucial en la isquemia-reperfusión puesto que ella es la causa y víctima de las consecuencias de esta situación. La isquemia-reperfusión daña no solo el miocardio, sino también el lecho vascular coronario, aumenta los niveles plasmáticos de ET-1, induce el predominio de la ET-1 sobre el NO, aumenta la respuesta coronaria alaET-1 y altera el papel de sus receptores en esta respuesta. Todo ello podría contribuir a la disfunción de la circulación coronaria y el fenómeno de no-reflujo y, como consecuencia, a la lesión por perfusión. Así, la ET-1 podría ocupar un papel destacado en la fisiopatología de la lesión por perfusión, y el uso de antagonistas de los receptores ETA/ETB podría proteger al corazón frente a la lesiones por perfusión.

*Corresponding Author: godofredo.dieguez@uam.es
Received: February 11, 2016 Accepted: April 15, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 1 (2016), pp. 14-50
Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Ischemic heart disease is the most lethal of cardiovascular diseases, and it is one of the leading causes of morbidity and mortality in humans worldwide, including European Union and Spain. The social impact of this disease is considerable, not only because of the mortality that it causes, but also because of its consequent morbidity, loss of quality of life, and high economic cost. This impact is largely due to its pathophysiological mechanism, namely, cardiomyocyte death.

In ischemic heart disease, cardiomyocyte death almost always occurs as consequence of severe and prolonged myocardial ischemic events, which are mostly due to complications from atherosclerotic plaques in epicardial coronary arteries, causing an acute coronary syndrome. Coronary atherosclerosis develops in a clinically silent manner over years and only causes clinical symptoms when the arterial lumen is greatly narrowed, either due to atherosclerotic plaque growth or the development of intracoronary thrombosis induced by plaque complication, resulting in a loss of endothelial

continuity due to erosion, fissure, or endothelial rupture. Endothelial dysfunction and damage is a main factor for the formation of atheromatous plaques and development of coronary artery disease. Many clinical trials have suggested that lifestyle and pharmacologic interventions are effective in attenuating atherosclerotic disease progression and events development in coronary vasculature. Thus, preventing the appearance of atherosclerosis coronary plaques or their progression should be the first line of action against the disease.

The atheromatous plaques, by producing severe stenosis and/or thrombosis of a coronary artery, may induce a pronounced reduction (>80%) of coronary blood supply in the distal territory of myocardium supplied by the artery affected, thus causing acute myocardial infarction (AMI). This entity frequently occurs in persons >45 years old, of which 1/3 die within 28 days after beginning clinical symptoms. Studies of sex differences in long-term mortality after AMI have reported mixed results. Main determinants in evolution of patients with AMI are individual factors (e. g., age of patient), size of infarct, and time elapses between symptoms felt by patient and instauration of an effective treatment. The treatment should be directed to salvage the maximum amount possible of myocardium, by applying the adequate treatment as early as possible. Ischemic myocardial injury may also occur in clinical conditions such as heart transplantation, cardiac bypass, and coronary stenting after acute myocardial infarction (for details, see References 1-5).

The incidence and fatality rates of an AMI are going down in developed countries as a result of better prevention and treatment. Basic and clinical researchers agree that the most effective treatment of AMI is timely (early) reperfusion by opening the stenosed/thrombosed coronary artery, thus restoring the blood flow to the ischemic myocardial territory. Timely restoration of blood flow to the ischemic zone of the myocardium limits infarct size and reduces mortality, and this reperfusion can be performed in patients, either by using thrombolytic agents (6) or percutaneous coronary angioplasty (7), and both of these procedures were initiated around 1975 (8). AMI is a dynamic process that frequently reaches the total extension of myocardium necrotized within 6h after initiating the artery occlusion. Myocardial reperfusion intends to stop expansion of myocardial damage, and this procedure represents a major step in treatment of patients with AMI. Reperfusion therapy is one of the most successful therapies of modern medicine. Today, primary percutaneous coronary angioplasty is the preferred strategy if the procedure can be performed by an experienced team within 90–120 min after the patient first presents (8). It is preferred because it can confer more rapid and complete revascularization, induces revascularization in a larger number of infarct-related coronary arteries and is associated with fewer bleeding complications. However, because access to invasive

facilities is limited, thrombolytic therapy is still employed in many centers worldwide (8). In advanced countries, patients are now receiving the benefits of reperfusion therapy, and reducing time between symptoms onset and reperfusion therapy, is at present one of the main goals in the management of patients with AMI (9).

Also, basic and clinical researchers agree that not all it is favorable with myocardial reperfusion, and as Braunwald and Kloner written at 1985, myocardial reperfusion is “a double edge sword” (10). Whereas it is very difficult to study the pathogenesis of human coronary syndromes such as AMI, experimental models have provided good reproducible means to explore different aspects of the events that occur after myocardial ischemia-reperfusion. Around the 1960s, R. B. Jennings and cols. brightly demonstrated in laboratory animals the consequences of a temporary occlusion of a coronary artery, as well as those of reperfusion by releasing this coronary occlusion (11, 12). They observed that reperfusion may also damage myocardium exposed to ischemia, and this damage is added to myocardial damage caused by ischemia itself, and it known as reperfusion injury (13). This phenomenon has been also described in the clinical setting (10).

The coronary circulation plays a crucial role in the development of the effects of ischemia-reperfusion on the heart tissue. Indeed, the coronary circulation is the cause of the consequences of interruption of blood supply to cardiac tissue, as coronary artery disease is culprit of this interruption, and also it is victim of these consequences of blood flow deprivation as ischemia-reperfusion damages not only cardiomyocytes but also coronary vasculature. Furthermore, the coronary circulation is also protagonist in the process of reperfusion aimed to reduce the consequences of ischemia-reperfusion. Therefore, the coronary circulation should be considered with attention as it could play a central role in path physiology of myocardial ischemia-reperfusion and reperfusion injury, and also should be considered as a target of therapeutical strategies for cardioprotection (14). However, spite of relevance of the coronary circulation in ischemia-reperfusion and reperfusion injury, this vasculature has received little attention in literature about this issue (14). The present Review focus on myocardial ischemia-reperfusion, paying particular attention to the coronary circulation and to role of nitric oxide and endothelin-1 in the regulation of this vascular bed under normal conditions and after ischemia-reperfusion. Also, it will be considered therapeutical strategies for ischemia-reperfusion injury, with greater mention to antagonists for endothelin receptors.

2. THE CORONARY CIRCULATION

2.1. General considerations

Over the past several decades, the major factors determining myocardial perfusion have been elucidated, and this knowledge has been incorporated in the

management of patients with ischemic heart disease. The basic understanding of the flow mechanics of coronary stenoses have been also translated to the cardiac catheterization laboratory where measurements of coronary pressure distal to a stenosis and coronary blood flow are routinely obtained (15, 16).

The coronary circulation provides oxygen and nutrients to heart tissue, and the myocardium is very sensitive to oxygen deprivation. Coronary blood flow is determined, essentially, by aortic pressure, myocardial

metabolism, neural factors, circulating vasoactive substances, and endothelial factors (1, 17, 18). Myocardial function is closely coupled to coronary blood flow and oxygen delivery, thus balance between oxygen supply and myocardial demand is a critical determinant of the normal heart function (1, 17-19). Figure 1 shows a schematic representation of different aspects of the human coronary circulation.

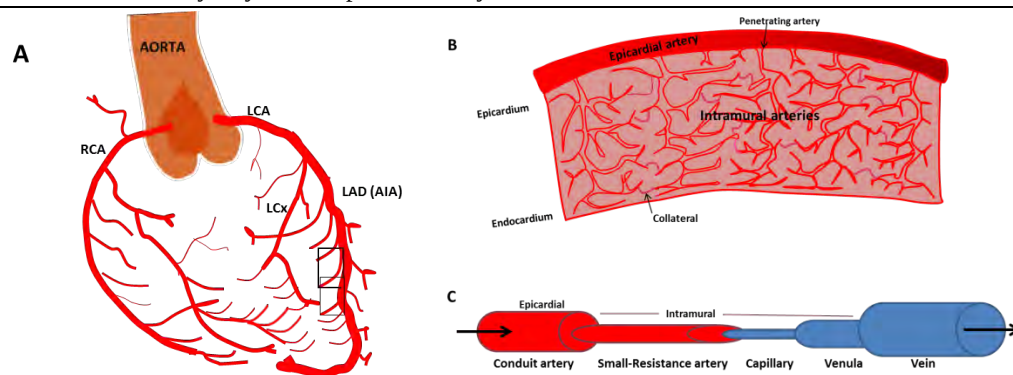


Figure 1. Schematic representation of the human coronary circulation: A) Drawing of the coronary circulation; LCA=left coronary artery; RCA=right coronary artery; LAD (AIA) =left anterior descending coronary artery; LCx=left circumflex coronary artery. B) Drawing of epicardial and intramural arteries; in the normal hearts, each area of myocardium is usually supplied by a single coronary artery and it does not have functional collaterals; and C) Drawing showing the different segments of coronary vascular system.

In the human heart, the blood supply to the myocardium is provided by the two main coronary arteries that arise from the aorta: the left coronary artery and the right coronary artery; the left coronary artery branches to the left anterior descending and circumflex coronary arteries (Figure 1A). The left and the right coronary arteries are epicardial arteries (1-3 mm in diameter), they divide on the surface of the heart in a base to apex direction, and they are considered conduit arteries. These arteries send tributaries (400-1, 500 μm in diameter) which penetrate transmurally through the myocardial wall from the outer epicardium to the inner subendocardium (Figure 1B). After penetrating the myocardium, they branch to small arteries and arterioles (75-200 μm in external diameter) which are the primary sights of coronary vascular resistance. From the arterioles, a dense network of capillaries arises, running parallel with the cardiomyocytes ($\sim 3, 500$ capillaries/ mm^2), with a gradient of vascularity favoring the endocardium; ratio of capillaries to cardiomyocytes is $\sim 1:1$. In addition, coronary microcirculation includes capillaries and postcapillary venules (Figure 1C). The coronary venous system is largely a mirror image of the coronary arterial system.

Under normal conditions, there is not measurable pressure drop in the epicardial arteries, indicating negligible conduit resistance. When a significant epicardial artery narrowing is present ($>50\%$ diameter reduction), the fixed conduit artery resistance begins to contribute significantly to total coronary vascular resistance and, when these arteries are severely narrowed

($>80\%$ diameter reduction), it may reduce resting blood flow. The major component of coronary vascular resistance under normal conditions mainly arises from small arteries and arterioles, consequently called resistance vessels. This resistance is dynamic and distributed throughout the myocardium across a broad range of vessel sizes (50-400 μm in diameter). Because the diameter of these vessels, and hence their resistance can be changed by passive and active mechanisms, they play a pivotal role in the regulation of coronary blood flow. There is normally little resistance contributed by capillaries and coronary venules, and their resistance remains fairly constant during changes in vasomotor tone (16-18).

Under resting conditions, a vasomotor tone exists to match oxygen delivery to metabolic need, and when elevated metabolic demand occurs, coronary blood flow can increase 5-fold primarily through arteriolar vasodilatation. This vasodilator reserve can also be utilized to maintain blood flow when perfusion pressure changes (16-18). When a 50% stenosis is present in a coronary conduit artery, this stenosis has little effect on blood flow due to autoregulatory reductions in arteriolar resistance (1, 16-18). However, during exercise or higher stenosis ($\sim 80\%$), blood flow may be compromised when arteriolar dilation is exhausted. Thus, conduit and resistance vessels work in harmony to defend myocardial perfusion. The inability of the microcirculation to compensate for changes in metabolism and perfusion pressure is one reason that examination of coronary arteriolar function is so important. There are a series of

collateral blood vessels that interconnects arteries, and under normal conditions these blood vessels have not functional connexions, but under some pathological conditions (e. g., arterial stenosis-obstruction) may provide functional salvage pathways of potentially ischemic areas of the myocardium (1, 16-18).

After ischemia-reperfusion, the coronary circulation deserves attention because of it is damaged in different degree and it is a prime determinant of myocardial ischemia-reperfusion injury: it determines the area at risk, the duration of myocardial ischemia, the residual blood flow through collaterals, the microvascular obstruction and the restoration of coronary blood flow during reperfusion. Also, the coronary circulation is the site of cardioprotective interventions with intermittent coronary occlusion/reperfusion. Inadequate consideration for the coronary circulation might easily diminish the magnitude of differences in infarct size between the possibly protected group and the control group (14).

2.2. The endothelium

The artery wall has three layers, which are termed, from outer to inside, adventitia, media and intima. The intima is covered by the endothelium, which is a single layer of cells lining the inside of vascular wall. Before 1980, the endothelium was merely considered as an anticoagulant sheet of cellophane, and at present it is accepted that the endothelium plays a crucial role in homeostasis of cardiovascular system. The healthy endothelium is able to produce a range of substances that regulate vascular tone, cellular adhesion, thromboresistance, smooth muscle cell proliferation, and vessel wall inflammation (19, 20).

In 2009 P. M. Vanhoutte wrote: "First, there was Robert Furchgott. He simply and brilliantly demonstrated that endothelial cells play a pivotal role in relaxations evoked by acetylcholine in isolated arteries, and do so by activating muscarinic receptors of these cells" (21). In the late 1970s and early 1980s two cornerstone observations were made: the first, by Furchgott and Zawadzki, was the discovery of the "obligatory role of the endothelium in vasorelaxation by acetylcholine" (22), and the second, by Hickey and col., was the first description and characterization of a vasoconstrictor polypeptide produced by endothelial cells in culture (23). From the

seminal observation by Furchgott and Zawadzki in 1980 (22), an exponential number of studies have been performed by many researchers, in many laboratories through worldwide, and using different vascular beds and different experimental preparations (isolated blood vessels, isolated organs, anesthetized and unanesthetized animals). The intense laboratory and clinical research have let us to know that the endothelium can produce and release vasodilator and vasoconstrictor substances, as well as to know some pathways that regulate endothelial-vascular smooth muscle communication (19). The reading of an interesting and nice article about the history of this issue, related by R. F. Furchgott, is recommended (24).

The endothelium constitutes a large organ, and it is formed by approximately 10^{13} cells, which represents ~1, 5% of the total body mass (25). The endothelium derives from mesoderm, and in most of vascular beds it forms a continuous and non fenestrated layer that covers the internal surface of the blood vessel wall. When it is damaged, for instance after atherosclerosis, can be replaced by regenerated endothelial cells that may not have the same properties as normal cells (26, 27). The endothelium can produce and release endothelium-derived relaxing factors such as nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI₂), endothelial derived hyperpolarizing factor (EDHF), hydrogen peroxide, carbon monoxide, hydrogen sulphide, C-t natriuretic peptide, and others; of these factors the most relevant seem to be NO, PGI₂ and EDHF. The endothelium also can produce and release endothelium-derived contracting factors such as endothelin peptides, angiotensin II, thromboxane A₂; in some circumstances hydrogen peroxide and prostacyclin can produce vasodilatation or vasoconstriction (19, 25). Under normal conditions predominates the release of vasodilator substances, particularly NO and, in consequence, the normal endothelium is pro-vasodilator. However, under pathological conditions in which the endothelium is damaged (i. e., atherosclerosis) secretion of vasodilator substances are reduced, whereas the release of vasoconstrictor substances such as endothelin-1 (ET-1) may be augmented, the endothelium being now pro-vasoconstrictor (19, 25, 26) (Figure 2).

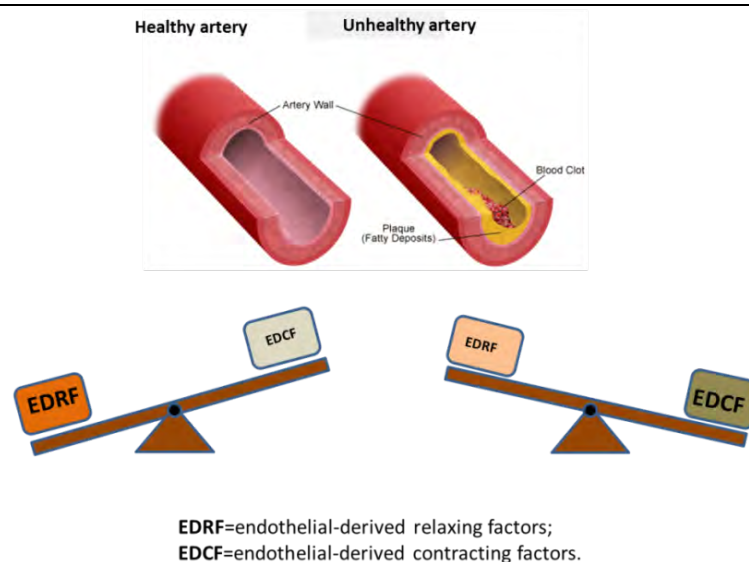


Figure 2. Schematic representation of the relation of the endothelial release of relaxing and contracting factors in healthy, normal arteries (left), and unhealthy, diseased arteries (right).

Early changes in endothelial function are indicators of future cardiovascular morbidity and mortality. Endothelial cell dysfunction related with aging in healthy persons is linked to telomere shortening, but it could be accelerated by risk factors, such as atherosclerosis, arterial hypertension, smoking, diabetes mellitus, obesity, and mechanical stress of a high heart rate (26-30). Such insults accelerate a proatherogenic phenotype (30-32). The statement “You are only as old as your endothelium”, attributed to Dr. Rudolf Altschul (1901-1963), may be right.

Our understanding of the role of the endothelium in the coronary vasculature under normal and pathological conditions is very notable (1, 15-18, 20, 30, 31). Due to its hemodynamic characteristics, the coronary vasculature may be the prime site for endothelial dysfunction (18) and displays an unusual gene pattern compared with other blood vessels, with lower endothelial NO synthase (eNOS) and higher of ET-1 mRNA expression (32). This pattern predisposes coronary vasculature to endothelial dysfunction and atherosclerosis, and coronary arteries are a main target for the aging and effects of cardiovascular risk factors. Summarizing, the coronary vasculature is prone to predominate the effects of ET-1 over those of NO with aging, cardiovascular risk factors and some pathological situations.

The first demonstration of endothelial dysfunction in atherosclerotic coronary arteries using intracoronary infusion of acetylcholine (Ach) and quantitative coronary angiography dates back to 1986 (33). This observation drew attention to the functional manifestations of atherosclerosis such as exaggerated vasoconstriction as a consequence of poorly functioning endothelium. Later, less invasive techniques were developed using mainly the forearm circulation as a surrogate for coronary arteries (30, 31, 34, 35).

Atherosclerosis, the main cause of acute coronary syndrome, courses with endothelial dysfunction, and this dysfunction could play a relevant role in pathophysiology of myocardial ischemia-reperfusion. And also, myocardial ischemia-reperfusion by itself is a clinical and laboratory entity that may be accompanied by damage and dysfunction of coronary vasculature, particularly of the endothelium (see below). These ideas support the interest for investigate the functional aspects of the coronary circulation after myocardial ischemia-reperfusion in order to know the pathophysiology of this condition, as well as to design therapeutic strategies to ameliorate the consequences of acute myocardial infarction and reperfusion injury, and thus the outcome of patients with these abnormalities.

In the past decade, many studies have suggested that the noninvasive assessment of endothelial function may provide useful information for individual patient risk, progress, and guidance of therapy.

2.3. Nitric oxide (NO)

In mammals, including humans, nitric oxide (nitrogen oxide or nitrogen monoxide) is an important cellular signaling molecule involved in many physiological and pathological processes (for revision of this issue, see reference 36).

NO is a gas that has not colour, odour, or taste, with low solubility in water at room temperature and at atmospheric pressure. In blood, it reacts predominantly with molecules that have orbitals with unpaired electrons, which are typically other free radicals (superoxide ion, hydroxyl ion) or transition metals like heme iron (hemoglobin, myoglobin, cytochromes). Reactions of NO differ between in vitro and in vivo systems. In in vitro systems, the main degradation product of NO is NO²⁻ (nitrite), while in vivo the main product is NO³⁻ (nitrate)

as a consequence of the reaction of NO with hemoglobin.

This molecule can become highly toxic to tissues during some pathological conditions (e. g., ischemia and reperfusion). NO by reacting with anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$) forms peroxynitrite ($ONOO^-$), which is a powerful oxidant and seems to be a determinant in the contrasting roles of NO in physiology and pathology. Peroxynitrite interacts with lipids, DNA, and proteins via direct oxidative reactions or via indirect, radical-mediated mechanisms, which may commit cells to necrosis or apoptosis. In vivo, peroxynitrite generation represents a crucial pathogenic mechanism in conditions such as stroke, myocardial infarction, chronic heart failure, diabetes mellitus, circulatory shock, chronic inflammatory diseases, cancer, and neurodegenerative disorders.

The regulation and synthesis of NO by mammalian cells has been the focus of many reviews (36, 37), as have been many of its physiological and pathological actions (38, 39). For a century, nitrovasodilators had been used clinically without understanding their mechanism of action. Alfred Nobel lamented the irony that he was taking nitroglycerin to treat angina after making his fortune developing dynamite.

As several studies suggested that the characteristics of NO and EDRF are similar, R. Furchgott proposed that the EDRF produced by endothelium is NO (40, 41), and Ignarro provided additional evidence supporting the identification (42, 43). Moncada et al. were able to directly measure NO produced in vivo (44).

The synthesis of NO from arginine is catalyzed by

three forms of NO synthase (endothelial NO (eNO) synthase, neuronal NO (nNO) synthase, and inducible NO (iNO) synthase). The brain proved to be a rich source of NO synthesis and allowed the first NO synthase to be cloned and purified (45, 46). It is called nNOS or NOS1 as it was the first synthase to be cloned. The NOS1 gene has the most complex genomic organization in humans with multiple splice variants being produced (47). The second NO synthase to be cloned was isolated from macrophages and is known as NOS2 or iNOS (inducible NOS) because it is readily induced in many tissues by proinflammatory cytokines. Because NOS2 can be strongly induced by proinflammatory stimuli, it induces often a high production of NO. The first source of NO identified was the endothelium, but eNO synthase was the last to be cloned and is known as eNOS or NOS3. NOS3 binds to plasma membranes and is typically associated with caveolin (48). It is strongly activated by the entry of calcium through membrane-bound receptors and is also regulated by phosphorylation (49). NOS3 is also found in neurons and other tissues in addition to endothelium (36). NO is also produced by myocardium, and it is involved in several aspects of physiological myocardial function (e. g., excitation-contraction coupling; myocardial relaxation; diastolic function; the Frank-Starling response; heart rate; β -adrenergic inotropic response; and myocardial energetics and substrate metabolism) (50, 51). Figure 3 summarizes the source and the beneficial effects of NO on blood vessels.

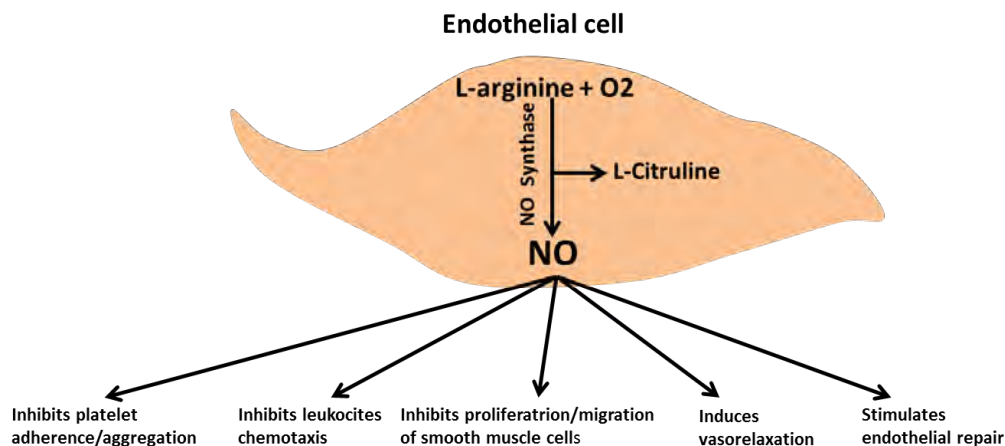


Figure 3. Summary of the source and beneficial effects of NO (nitric oxide) in blood vessels.

NO is an indicator of vascular endothelial function, and measurements performed in control (normal) humans provide that eNO synthase activity is 7-8 U/mL, and NO levels (expressed as NO^3) are approximately 60 μ mol/L. NO is released from the endothelium under normal conditions as the endothelium acts as a sensor that is stimulated by flow changes, stretch, a variety of circulating vasoactive substances, and inflammatory mediators. The release of NO can increase or decrease in patients under certain pathological conditions. The

release of NO can be pharmacologically inhibited by using analogues of arginine such as Nw-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and L NG-monomethyl-L-arginine (L-NMA). These inhibitors have been used in laboratory experiments to explore contribution of NO in the regulation of vascular tone (52, 53).

In general, NO acts stimulating intracellular guanylate cyclase, and this enzyme converts GTP in cGMP. There are two types of guanylate cyclase: one is an integral membrane protein with an extracellular

domain and an intracellular catalytic domain that synthesizes cGMP; the other is cytoplasmatic (soluble guanylate cyclase) and is the isoform that is the form activated by NO. In the nervous system, NO acts directly to open cyclic nucleotide-gated channels, and it activates the cGMP-dependent protein kinase (36). NO, after it is released by the vascular endothelium, is free to diffuse into adjacent smooth muscle cells of the vascular wall, and in these cells directly activates soluble guanylate cyclase. This enzyme induces the formation of cGMP, which in turn activates cGMP-specific protein kinases that affect ion channels, calcium homeostasis, or phosphatases, or all of these, causing relaxation of vascular smooth muscle (36).

As loss of NO bioavailability indicates a broadly dysfunctional phenotype across many properties of the endothelium, the assessment of its vasodilator properties resulting from NO and other molecules may provide information on the integrity and function of the endothelium. Interestingly, most, if not all, cardiovascular risk factors are associated with endothelial dysfunction and risk factor modification leads to improvement in vascular function (37, 54). Over the past 35 years, many methodological approaches have been developed to measure the (patho) physiological function of the endothelium in humans (55), but evaluation of endothelial function as a clinical tool in daily practice is not established yet.

From the beginning, endothelial function has been regarded as an important factor in the regulation of the coronary circulation and it may be of pathophysiological significance in several coronary diseases (1, 15-18). Endothelium-dependent vasodilatation has been found in coronary vessels from dogs (56) and man (57). Then it was reported that human coronary vessels *in vitro* release NO (58), that NO plays a significant role in modulating basal vasomotion and endothelial-dependent dilatation in the coronary circulation of dogs (59), and that the coronary vascular relaxation by NO, as well as by nitroprusside is associated with an increase in cGMP (60).

In our laboratory we have carried out a series of experiments to examine the functional role of NO in the coronary circulation under normal conditions, and they were performed using three laboratory models (anesthetized goats, isolated, perfused hearts from rats, and isolated coronary arteries from pigs). In these three models we found that in the coronary circulation, NO may be released under basal conditions, it produces a basal vasodilator tone, it mediates the vasodilation in response to Ach, and it reduces the response to vasoconstrictors such as ET-1. In anesthetized goats, L-NAME, injected by *i. v.* route, decreased resting coronary blood flow and increased systemic arterial pressure. These hemodynamic effects of L-NAME were partially

reversed by L-arginine injected intravenously. We also found that during the effects of L-NAME, the coronary vasodilatation to Ach was attenuated, to sodium nitroprusside was increased, and to diazoxide was unaffected. Graded coronary hyperemic responses after 5, 10 or 20 s of coronary occlusion were increased during treatment with L-NAME. These results suggest: a) endogenous NO is involved in regulation of coronary circulation by producing a basal vasodilator tone; b) Ach-induced coronary vasodilatation is mediated, in part, by NO; and c) inhibition of basal endogenous NO production induces supersensitivity of coronary vessels to nitrovasodilators and enhances hyperemic responses after short periods of ischemia of the myocardium (61). This agrees with observations by others in the coronary circulation, and supports the idea that a vasodilator tone mediated by NO is present in the coronary circulation. The effects of sodium nitroprusside were increased during the action of L-NAME. Sodium nitroprusside has been used as a donor of exogenous NO and produces vasodilatation in a similar way to NO (62). Enhanced vasorelaxant responses to sodium nitroprusside and other nitrous compounds have been found in the absence of a functional endothelium or in the presence of L-arginine analogues, and this has been related to an increased sensitivity of guanylate cyclase in vascular musculature to exogenous NO when production of endogenous NO is reduced (63, 64). Therefore, it appears that the removal of endogenous NO in the vasculature could lead to increases in sensitivity to vasodilators that act by stimulating soluble guanylate cyclase. Reactive hyperemia after short ischemias of the myocardium is known to occur in the coronary circulation, and metabolic and hemodynamic factors that contribute to the hyperemic response have been explored. However, little is known about the role of the endothelium in the coronary hyperemic response (56, 59, 65).

Also in anesthetized goats, when L-NAME was intracoronarily injected, it reduced resting coronary blood flow without changing systemic arterial pressure. These effects of L-NAME were also partially reversed by L-arginine. Isoproterenol, adenosine and Ach, injected intracoronarily, increased coronary blood flow, and after treatment with L-NAME the increases in coronary blood flow induced by isoproterenol and Ach were reduced, whereas those induced by adenosine were increased further. Therefore, it is confirmed that in the coronary circulation NO produces a basal vasodilator tone under normal conditions, and it is suggested that NO may be an intermediate in the coronary vasodilatation in response to beta-adrenoceptor stimulation and Ach, and that the vasodilatation due to adenosine is potentiated during reduction of endogenous NO production (66) (See Figure 4).

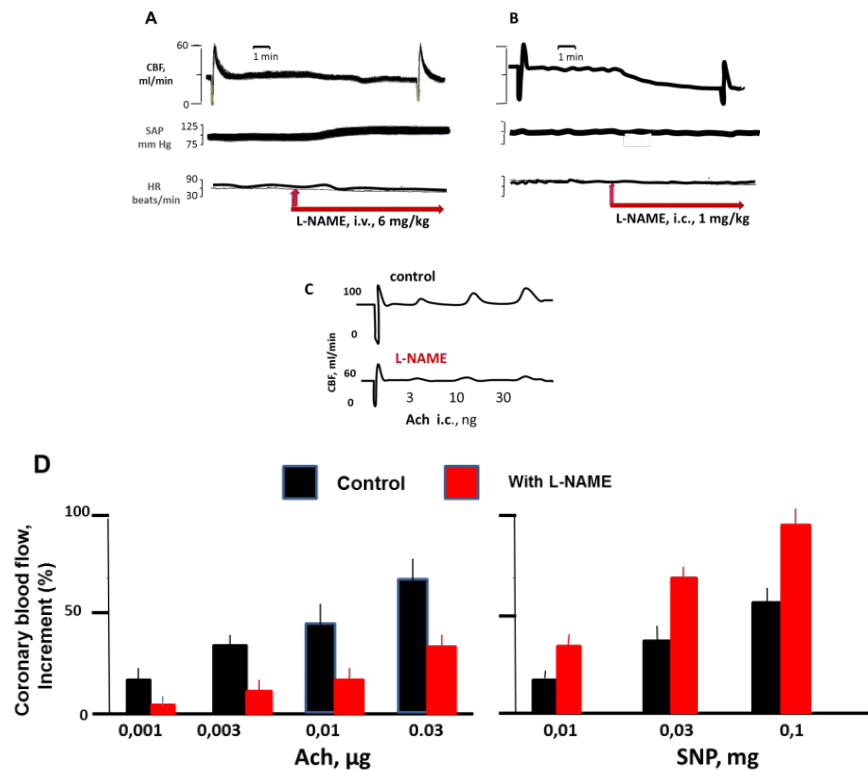


Figure 4. Actual recordings of coronary blood flow (CBF, electromagnetically measured), systemic arterial pressure (SAP) and heart rate (HR) obtained in anesthetized goats: A) during i. v. administration of the inhibitor of NO synthesis L-NAME; B) during intracoronary (i. c.) administration of this substance; and C) showing the effects of intracoronary injections of acetylcholine (Ach) on coronary blood flow before (control) and after L-NAME injected by i. v. route; D) Summary of the effects of intracoronary injections of acetylcholine (Ach) and sodium nitroprusiate (SNP) on coronary blood flow in anesthetized goats under control conditions and after i. v. administration of L-NAME.

2.4. Endothelin-1 (ET-1)

Endothelin-1 is a member of the group of endothelins, which are a family of 21- amino-acid peptides, and they include endothelin-1 (ET-1), endothelin-2 (ET-2) and endothelin-3 (ET-3); they share structure homology with the snake venom sarafotoxin b and c (S6b and S6c) (67, 68).

The presence of an endothelium-derived constricting factor (EDCF) was perceived 1 year after the revelation of the endothelium-derived relaxant properties of the endothelium (69). However, it was 8 years later that Yanisagawa et al. identified an EDCF, ET-1 (70, 71). Two years later, two types of receptors for ET-1 were identified (72, 73), and shortly after the discovery of ETA y ETB receptors, M. Clozel et al. presented in 1993 the first orally active ET-1 receptor antagonist, Ro 46-2005 (74).

ET-1 is one of the most potent endogenous vasoconstrictor identified so far (67, 68). This peptide induces a long-lasting contraction of arteries of different regions, including coronary arteries, and it contributes to cardiovascular homeostasis through several pathways that impact on the regulation of basal vascular tone (75). It is released continuously, mostly from endothelial cells, by a constitutive and regulated pathway (76), and acts

primarily as a paracrine regulator of vascular tone (75-78). In addition to endothelial cells, ET-1 is also produced by vascular smooth muscle cells, cardiomyocytes, leukocytes, macrophages, some types of neurons, and other types of cells (67, 77, 78). ET-1, at elevated concentrations, also induces inflammatory effects and promotes proliferation of vascular smooth muscle cells (67, 68, 79).

ET-1, ET-2 and ET-3 are encoded by different genes, on chromosomes 6, 1 and 2, respectively (67, 68). In endothelial cells, the product of the ET-1 gene is processed from a large precursor peptide of approximately 200 amino acid residues (preproET-1) to 39-amino-acid prohormone (big ET-1), which has about 1% of the activity of ET-1. This prohormone is then cleaved to form ET-1 by the action of two endothelin-converting enzymes (ECE-1 and ECE-2) (67, 68). Small amounts of big endothelin and ET-1 are secreted into circulating blood and into interstitial space of the blood vessel wall (67, 68). In normal human adults, plasma levels of ET-1 are relatively low (0. 7-6 pg/mL (75, 76). ET-1 is cleared from the circulating plasma, and the majority is retained by the lungs and cleared from the circulation by binding to endothelin ETB receptors (67, 68). ET-1 is not stored in secretory granules, and factors that active its secretion may be angiotensin II,

catecholamines, growth factors, hypoxia, insulin, lipoproteins, thrombin; contrarily, factors that inhibit its secretion are NO, atrial natriuretic peptide, prostaglandin E, PGI₂ (67, 68). The concentration of ET-1 in plasma may increase in some cardiovascular diseases such as myocardial infarction, ischemia-reperfusion syndrome, and heart failure (78, 80).

The biological effects, including vascular effects of ET-1 may be mediated by two types of receptors, i. e., endothelin ETA and endothelin ETB; endothelin ETB receptors are subdivided in ETB1 and ETB2. ETA receptors are located in smooth muscle cells and coupled to protein G, and its activation leads to increment of cytoplasmic Ca, and then vasoconstriction (67, 68). The debate in literature exists whether or not ETA and ETB receptors should be blocked to provide most clinical benefit (67, 76, 81); this feature may be of clinical relevance, for example in treatment of myocardial reperfusion injury. The ETA receptor has been considered as the bad one, while the ETB receptor has been considered as the good one; this distinction is based on the role of ETB1 in the clearance of circulating ET-1 and on the finding that activation of this particular receptor produces vasodilation by releasing NO. Whereas the role of ETA receptors in vascular function is relatively well known, the role of ETB receptors is less known. Both ETB1 and ETB2 receptors are also a G-protein coupled receptor and have been identified in numerous types of blood vessels, including coronary arteries. ETB1 receptors, situated in the endothelium, mediate the release of relaxant factors (NO, PGI₂, EDHF), and they may play a role in ET-1 clearance, and ETB2 receptors, situated in vascular smooth muscle cells, mediate the increase of concentrations of intracellular Ca, protein kinase C, mitogen-activated protein kinase and other pathways of vascular smooth cells contraction and cell growth (67, 68).

In spite of many data demonstrating that ET-1 is a powerful vasoconstrictor, there are also data suggesting that under healthy conditions, ET-1 can also induce in vivo vasodilatation. In any case, the overall effects of ET-1 on vascular tone in vivo maybe the result of the balance between the effects mediated by ETA and ETB2 receptors located in smooth muscle cells, and the effects mediated by ETB1 receptors located in endothelial cells (82, 83), and this could depend on whether blood vessels are healthy or unhealthy. Aging and pathological conditions (e. g., cardiovascular diseases) facilitate the predominance of the vasoconstrictor effects of ET-1.

Another cardiovascular function that may be of relevance is that ET-1 may be a regulator of cardiac physiology and pathology. Produced locally within the myocardium in response to diverse mechanical and neurohormonal stimuli, ET-1 seems to modulate cardiac contractility. During pathological cardiovascular

conditions such as ischemia, left ventricular hypertrophy and heart failure, myocyte expression and activity of the ET-1 system is enhanced, allowing the peptide to both initiate and maintain maladaptive cellular responses. Both the myocardial acute and chronic effects of ET-1 are dependent on the activation of intracellular signaling pathways, regulated by the inositol-trisphosphate and diacylglycerol produced upon activation of the ETA receptor. Subsequent stimulation of protein kinases C and D, calmodulin-dependent kinase II, calcineurin, and mitogen-activated protein kinases modifies the systolic calcium transient, myofibril function and the activity of transcription factors that coordinate cellular remodeling (67, 68).

Due to its potent effect on the coronary circulation, the interest for the role of ET-1 in the physiology and pathology of this particular vasculature increased rapidly. In the first publication where ET-1 was identified, also it was indicated that this peptide provokes a pronounced constriction of isolated coronary arteries (70, 71), and since this observation most of data show that ET-1 produces pronounced coronary vasoconstriction in vivo (84, 85) and in vitro (70, 71, 86, 87).

In our laboratory we found that ET-1 evokes marked coronary vasoconstriction in vivo and in vitro. In anesthetized goats, i. v. injections of ET-1 increased systemic arterial pressure, did not change resting blood flow in the left anterior descending or left circumflex coronary (LCx) arteries, and in the middle cerebral artery (MCA) arteries, but it increased coronary and cerebral vascular resistance, and this increment was higher in the coronary circulation than in the cerebral circulation. In other group of anesthetized goats, intra-arterial injections of ET-1 decreased the LCx flow more than MCA flow. In isolated segments from large coronary and cerebral arteries from goats, ET-1 caused contraction, and the concentration causing 50% of the maximal effect and the maximal contraction were higher in coronary arteries than in cerebral arteries. The in vitro reactivity of these two types of arteries was unaffected by endothelium removal or by indomethacin. Therefore, ET-1 may produce coronary and cerebral vasoconstriction in vivo and in vitro, probably by acting directly on vascular musculature. The results from this study suggest that the sensitivity to this peptide is higher in isolated cerebral arteries than in isolated coronary arteries, but the reactivity in vivo could be higher in the coronary circulation than in the cerebral circulation (88). The coronary vasoconstrictor effect of ET-1 was also observed in isolated, perfused hearts from rats (89), and in isolated coronary arteries from pigs (90). Figure 5 shows actual recordings of the coronary effects of ET-1 in one anesthetized goat and in one isolated, perfused rat heart.

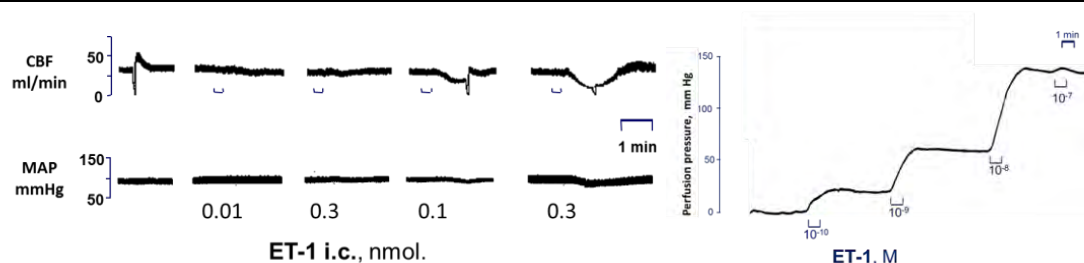


Figure 5. Actual recordings of the coronary effects of ET-1 obtained in one anesthetized goat (left) and in one isolated, perfused rat heart (right); I. c. =intracoronary.

There are studies suggesting that the coronary vasoconstriction by ET-1 is mediated by ETA receptors in humans (91), pigs (92) and rats (93), and that the role of ETB receptors is not clear, although it may be of less significance (91). Balwierczak (94) reports data suggesting that coronary response to ET-1 is mediated by both ETA and ETB receptors. With regard to the role of NO, it has been suggested that ET-1 can release NO in the coronary vasculature, and that this NO induces vasodilatation (92, 95) and counteracts the vasoconstriction produced by ET-1 (93). Regard to the role of prostanoids, the results reported are contradictory (93, 95). In our laboratory, we observed that ET-1, intracoronarily injected, produced marked reductions in coronary blood flow, and that these effects were diminished by BQ-123, specific antagonist for endothelin ETA receptors, but not during the infusion of BQ-788, specific antagonist for endothelin ETB receptors. IRL 1620, specific agonist for endothelin ETB receptors, intracoronarily injected, slightly reduced basal coronary blood flow. The effects of IRL 1620 were not modified by BQ-123 or BQ-788. With L-NAME, the reductions of coronary blood flow by ET-1 were potentiated and those

by IRL 1620 were not changed. Meclofenamate (cyclooxygenase inhibitor) modified neither the basal values of hemodynamic variables nor the coronary effects of ET-1 and IRL 1620. Therefore, ET-1 produces pronounced coronary vasoconstriction, which may be mediated by endothelin ETA receptors, with no participation of endothelin ETB receptors; NO, but not prostanoids, may inhibit ET-1-induced coronary vasoconstriction. Also, it is suggested that the coronary vasoconstriction by ET-1 may impair cardiac performance due to heart ischemia (96). From the studies with ET-1 and L-NAME in isolated, perfused hearts from rats (89) and in isolated coronary arteries from pigs (90) similar conclusions can be obtained about the modulatory role of NO in the coronary effects of ET-1 (see below Ischemia-reperfusion). Figure 6 shows an estimation of possible interaction between NO and ET-1 in the coronary circulation derived from the observed effects of inhibition of NO synthesis with L-NAME on the coronary response to ET-1 in anesthetized goats (96), isolated hearts from rats (89) and isolated coronary arteries from pigs (90).

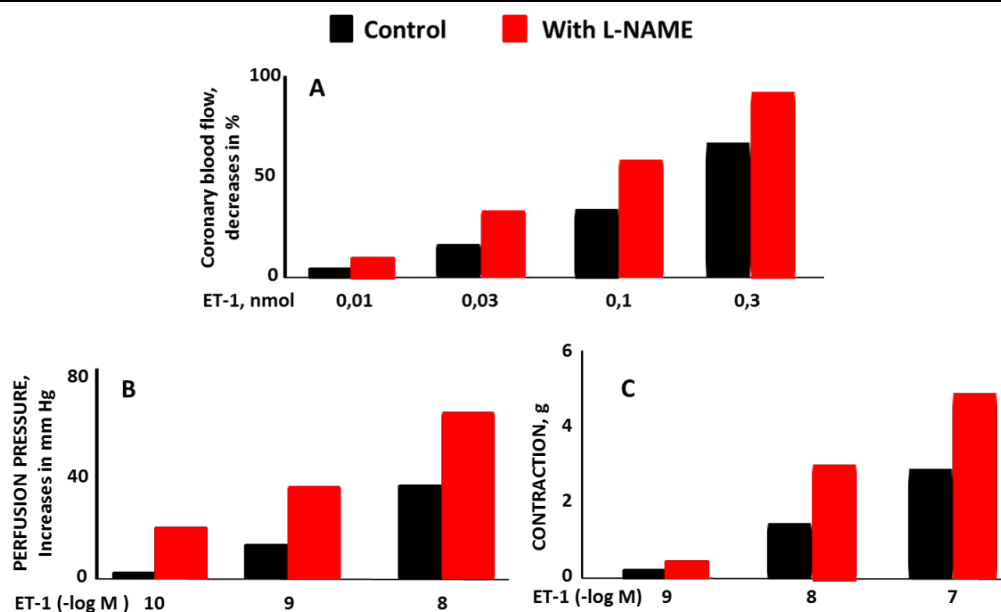


Figure 6. Summary of the effects of inhibition of NO synthesis with L-NAME on the action of ET-1 in the coronary circulation of anesthetized goats (A) and of isolated, perfused hearts from rats (B), as well as in isolated coronary arteries from pigs (C). The augmentation of the coronary response to ET-1 was qualitatively similar in the three experimental preparations.

ET-1 may also exert other vascular functions, as for example to modulate the response of coronary arteries to other types of vasoactive stimuli. The relaxation to isoproterenol, field electrical stimulation, Ach, and sodium nitroprusside was recorded in isolated coronary arteries from rats, in the absence and in the presence of ET-1. It was found that the treatment with ET-1 increased the relaxation to isoproterenol and did not modify the relaxation to electrical stimulation, Ach, or sodium nitroprusside. The increased relaxation to isoproterenol in the presence of ET-1 was also present in the presence of the endothelin ETB antagonist BQ788 but disappeared in the presence of the endothelin ETA antagonist BQ123 or the blocker of protein kinase C chelerythrine. Thus, curiously, ET-1 may potentiate coronary beta-adrenergic vasodilatation, due at least in part to stimulation of endothelin ETA receptors and activation of protein kinase C (97).

Arginine-vasopressin (AVP) is a hormone that may be of significance in the regulation of coronary circulation, particularly under certain pathological conditions such as myocardial infarction (see below Ischemia-reperfusion). In anesthetized goats we have found that under normal conditions, AVP produces coronary vasoconstriction and that this vasoconstriction may be mediated by vasopressin V1 receptors, without involvement of vasopressin V2 receptors; and it is probably modulated by NO, but not by prostanoids (98). These results in coronary vasculature of goats are in line with those obtained in coronary vasculature from rabbits (99). In one study performed in arteries taken from 7 vascular beds of rabbits, we found that in isolated arteries, AVP induced contraction in central ear (cutaneous), basilar (pial), renal, coronary and saphenous (muscular) arteries, but had no effect in mesenteric and pulmonary arteries; the order of potency for the contraction to this peptide was: ear > basilar > renal > coronary > saphenous arteries. Treatment with L-NAME

increased the contraction to AVP in ear (148% of control), basilar (150% of control), renal (304% of control), coronary (437% of control) and saphenous (235% of control) arteries. Removal of the endothelium increased the contraction to AVP in basilar (138% of control), renal (253% of control), coronary (637% of control) and saphenous (662% of control) arteries, but not in ear artery. Mesenteric and pulmonary arteries in the presence of L-NAME or after endothelium removal did not respond to AVP, as occurred in control conditions. The specific blockade of V1 vasopressin receptors was more potent than the blockade of both V1 and V2 vasopressin receptors to block the contraction to AVP. In arteries precontracted with endothelin-1, vasopressin or desmopressin did not produce relaxation. Therefore, these results suggest: a) most arterial beds studied (5 of 7) exhibit contraction to this peptide with different intensity; b) the vasoconstriction to this peptide is mediated mainly by stimulation of V1 vasopressin receptors, and c) endothelial NO may inhibit the vasoconstriction to this peptide, especially in coronary and renal vasculatures (99). From this study (99) it is apparent that NO plays a relevant role in modulating the vascular effects of AVP, and that this role is relatively more pronounced in coronary vasculature than in other vasculatures. In other study we compared the coronary effects of ET-1 and AVP in anesthetized goats, and the results suggest that ET-1 is more effective than AVP for producing coronary vasoconstriction (Figure 7), that NO may play a more relevant role for modulating the coronary vasoconstriction provoked by ET-1 than by AVP (Figure 7), and that cyclooxygenase products may not be involved in the coronary effects of these two peptides (100). From these results it can be estimated that after inhibition of NO synthesis with L-NAME, the increase in coronary vasoconstrictor effects produced by ET-1 is about two times higher than those induced by AVP (Figure 7).

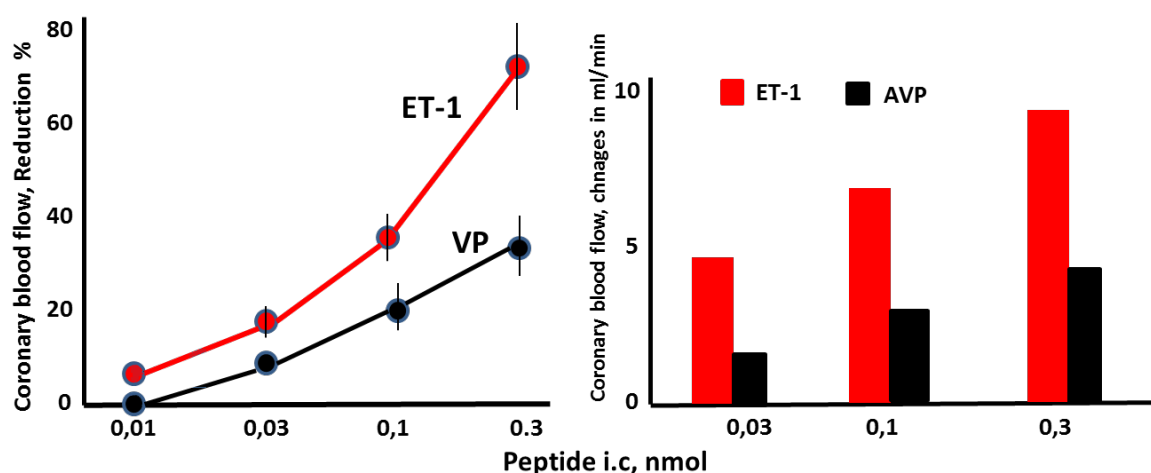


Figure 7. Comparison of the coronary vasoconstrictor effects of ET-1 and AVP (left), and of the relative role of NO in modulation of these effects (right). These studies were performed in anesthetized goats and both peptides were injected intracoronarily (i. c.).

2.5. Interaction between NO and ET-1

The functional interaction between NO/ET-1 deserves attention for its implication in the regulation of vascular function under normal and some pathological conditions. The release of ET-1 is inhibited by NO from the endothelium (83, 101), which make NO and ET-1 functionally closely interdependent, with a strong inhibitory effects of ET-1 on NO-mediated dilation, and vice versa (102-104). Endothelial dysfunction is associated with a decline in the contribution of NO in favor of greater influence of ET-1 on vascular function, and this phenomenon seems to be more evident in the coronary circulation under certain pathological conditions (80). This alteration in the balance between NO and ET-1 under certain conditions may be one of the aspects underlying dysfunction of the coronary circulation with deleterious consequences for the myocardium (78, 80).

Alterations in the NO/ET-1 axis can lead to disbalance in vascular endothelial function, resulting in pathological changes (105). With regard to this, it has been demonstrated that intracoronary infusion of BQ123 resulted in beneficial effects on coronary diameter and coronary blood flow in patients with coronary artery disease (106). Other observations also support the idea that in patients with coronary artery disease, less NO is produced and more ET-1 would contribute to vascular tone (80), and this hypothesis was tested in patients with coronary artery disease where it was proved that ET-1, via endothelin ETA receptors, contributed to the reduction of endothelial dilatory response (107). Other study in patients with coronary artery disease shows that blockade of endothelin ETA receptors or blockade of both endothelin ETA and ETB receptors improved the endothelium-dependent dilation in coronary arteries (108). Data from other studies also suggest that when more severe is atherosclerosis in coronary arteries, more importance has ET-1 in the control of coronary artery tone, thus functional contribution of this peptide appears to rise with the severity of coronary artery disease (80).

Other circumstance in which interaction between NO and ET-1 may be altered is during aging. This condition may be associated with alterations in the cardiovascular

system, and with increased ET-1 plasma levels. From a study performed in hearts from young (3 months old), aged (24 months old) and aged rats after 3 months of caloric restriction, it is suggested that aging is accompanied by alterations in myocardial and coronary responses to ET-1, that may be related to changes in expression of NO synthases and/or endothelin receptor subtypes, with some of these changes being prevented by caloric restriction (109).

The relation between NO and ET-1 may be also altered during hypotension. In anesthetized goats, during acute hypotension induced by constriction of the caudal vena cava, it was found that: 1) under normotension, ET-1 and AVP, intracoronarily injected, decreased coronary vascular conductance (CVC) by up to 56% for ET-1 and 40% for AVP; 2) under non-treated hypotension, the decreases in CVC by ET-1 were augmented approximately 1.5 fold, and those by AVP were not modified; 3) this increase in CVC by ET-1 was not affected by L-NAME and was reversed by meclofenamate, and 4) the coronary effects of AVP were not modified by any of these treatments. Therefore, acute hypotension increases the coronary vasoconstriction in response to ET-1 but not in response to AVP, and this increased response to ET-1 may be related to both inhibition of NO release and release of vasoconstrictor prostanoids (110).

The data exposed above suggest that NO and ET-1 play a relevant role in the regulation of the coronary circulation, and that a functional interrelation between these two substances could be of relevance in the control coronary vascular tone. When it is compared the role of NO in the coronary effects of ET-1 and AVP, the data suggest that the interaction between NO and ET-1 is greater than the interaction between NO and AVP in the regulation of the coronary circulation (see Figure 7).

Summarizing, the alteration in NO/ET-1 axis may play a relevant role on pathogenesis of coronary artery disease, and this axis may be a target for therapeutic interventions in some pathological conditions (e. g., atherosclerosis, myocardial ischemia-reperfusion) (Figure 8).

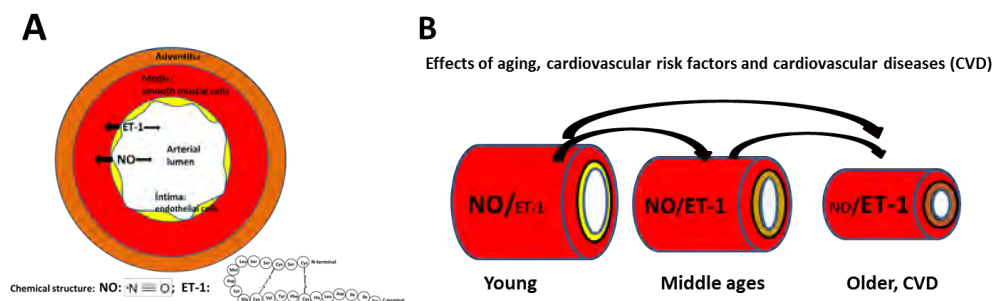


Figure 8. A) Schematic representation of a transverse section of a normal artery showing the layers of the artery wall, the release of NO and ET-1 by endothelial cells, and chemical structure of these two substances. B) Schematic representation of changes in the relative role of NO and ET-1 in the regulation of vascular tone after aging, cardiovascular risk factors and some cardiovascular diseases (CVD).

3. ISCHEMIA AND REPERFUSION

Sudden interruption of blood supply through a coronary artery can occur in patients as a result of the rupture or erosion of an atherosclerotic plaque situated in the wall of a coronary artery, with a superimposed thrombosis of this artery. Sudden interruption of blood supply through a coronary artery also can be reproduced in laboratory animals in which mechanical occlusion of a coronary artery can be induced. In both cases, coronary occlusion results in myocardial infarction if coronary perfusion is not restored within <40 min. Following a lag phase of fully reversible damage, myocardial infarction spreads depending on duration of coronary occlusion as a wave front phenomenon from the most central core of the affected coronary perfusion territory to its peripheral borders. The main determinants of the final amount of myocardium affected (size of the myocardial infarction) are the coronary circulation (area at risk), duration of coronary occlusion and presence of collateral blood flow. The area at risk is the anatomic perfusion territory of the coronary artery distal to the site of its occlusion, and this area determines myocardial infarct size, and infarct size is a principal determinant of prognosis of patients. The duration of coronary occlusion is determined both by the initial occlusive event and the restoration of coronary perfusion, and this restoration may be spontaneous or through a therapeutic intervention. In healthy and young experimental animals, the coronary circulation may be not compromised by atheromathosis and the onset and release of the mechanical coronary occlusion are clearly defined. In patients, however, the situation is very different and more complex, as coronary vasculature is usually diseased, and complete coronary occlusion may be preceded by intermittent changes in blood flow. In addition to the area at risk and the duration of coronary occlusion, residual blood flow through the coronary collateral circulation may be a significant determinant of infarct size. Studies in experimental animals have been performed in species with and without an innate coronary collateral circulation, and therefore the conditions differ. In humans, that have an innate coronary collateral circulation, the possibility of a recruitable collateral circulation may improve the outcome of patients with coronary artery disease (for details, see Reference 14). Questions that could be of interest about this particular issue are: damage of coronary vasculature and of cardiomyocytes develops in parallel during ischemia-reperfusion? Damage of coronary vasculature and of cardiomyocytes influences each other during this condition?

In relation to the effects of ischemia and reperfusion on the heart, there are recent excellent revisions (9, 13, 14, 111-114), and these effects are summarized below.

3.1. Effects of ischemia

Coronary occlusion results in abrupt deprivation of oxygen supply to the myocardium, which induces

ischemia and, if left uncorrected, death of myocytes by necrosis. Cessation of oxygen supply disrupts aerobic metabolism and oxidative phosphorylation with the consequent depletion of ATP and other energy compounds, and increased concentration of lactate and acidosis in cardiomyocytes. Depletion of energy compounds rapidly causes myocardial dysfunction and detrimental effects on biochemistry and metabolism of cardiomyocytes. These effects of oxygen deprivation, however, can be reversed if the duration of ischemia lasts <20 min. But if ischemia continues, irreversible injury develops, which is characterized by disruption of plasmatic, sarcolemmal and lysosomal membranes of the cardiomyocytes. This induces loss of osmotic balance, alteration of ions exchange through membranes and leakage of cellular metabolites into the extracellular space, with increased concentration and overload of calcium inside of cells and remaining closed the mitochondrial permeability transition pore. Damage of mitochondrial membranes reduces the ability of cells to produce ATP upon reperfusion, as well as the release of digestive enzymes, culminating in cell necrosis and apoptosis (13, 111-114).

The consequences of ischemia depend on several factors, as for example the duration of the occlusion (115), whether this ischemia is partial or global, and the presence or not of functional collateral circulation (116). Shrader et al. observed a reduction of 65% in ATP after 15 minutes ischemia (117), and Jones et al. in a murine model observed a reduction of 95% in ATP after 40 minutes ischemia (118). At the beginning of ischemia, the oxidative phosphorylation stops to work, and there is a transition from aerobic to anaerobic respiration, which may be detectable by observation of the electrocardiographic modifications (119) and the decrease of the myocardial contractility (120). In the myocardium, the activated glycogenolysis is quickly slowed down and the intracellular pH may decrease to 6.2 after 10 min (121). The cause of the decrease in pH during ischemia is not clear (122, 123).

3.2. Effects of reperfusion

In the 1960s, R. B. Jennings and cols. (12) and R. A. Krug et al. (124) published that reperfusion by itself can damage the myocardium previously exposed to ischemia, and advanced the pioneering concept of "reperfusion injury" (13). These authors showed that if reperfusion is applied within 20 min after provoking coronary occlusion, myocardial affected is recovered and did not die. When ischemia was prolonged to 20-40 min before institution of reperfusion, subendocardial myocardial cells underwent necrosis, but midmyocardial and subepicardial cells were salvaged. When duration of ischemia extended from 40 min to 3 h, necrosis affected in ischemic risk zone from the subendocardium to the subepicardium. During this ischemia, it develops the phenomenon known as "wave front phenomenon of ischemic cell death" (13, 111-114, 125, 126). These ideas

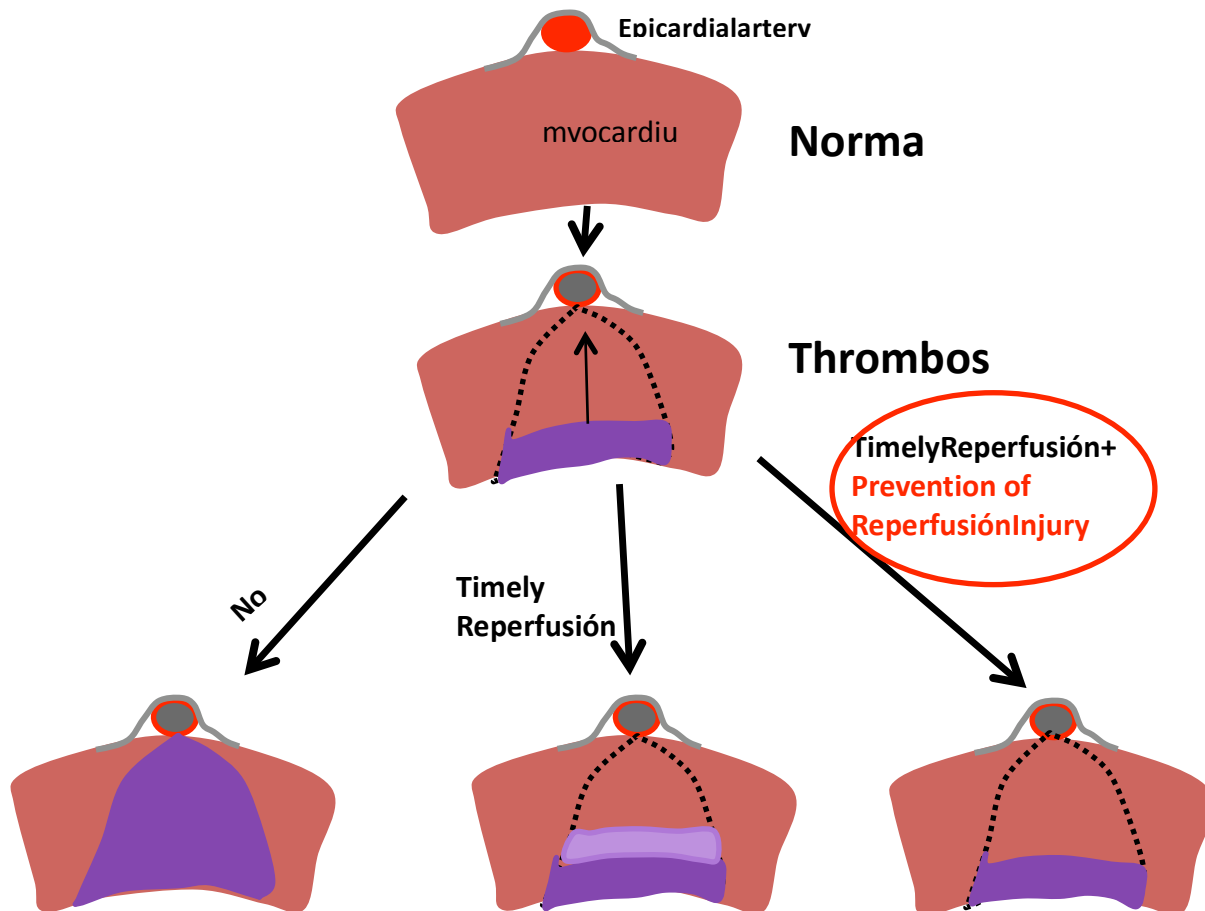


Figure 9. Schematic representation of a fragment of myocardium and an epicardial coronary artery under normal conditions and after artery thrombosis with theoretical evolution of myocardium necrosis, non-exposed and exposed to reperfusion. RI=reperfusion injury. Acute myocardial infarction is a dynamic process that frequently reaches the total extension of myocardium necrotized within 6 h after initiating the artery occlusion.

Restoration of blood supply to the zone of the myocardium exposed previously to ischemia (reperfusion) have beneficial effects and also adverse effects in the myocardium, by which Braunwald and Kloner wrote in 1985 that reperfusion by itself may be a “double-edge sword” (11). Reperfusion injury refers to myocardial, vascular, and/or electrophysiological dysfunction that is induced by the restoration of blood flow to previously ischemic myocardial tissue. It is recognized four forms of reperfusion injury, of which two may be reversible and other two may be irreversible (11):

1) Reversible forms: a) cardiac arrhythmias, particularly ventricular arrhythmias, which usually self-terminate or are easily treated (125), and b) myocardial stunning, with contractile ventricular dysfunction as consequence of alteration of myocardial contractile

apparatus (128).

2) Irreversible forms: a) *microvascular plugging*, first described by Krug et al. in 1966 (124). It may be a consequence of capillary damage, endothelial and cardiomyocyte cells swelling, micro-embolization of material released from the atherosclerotic plaque, micro-thrombi, release of vasomotor and thrombogenic substances, and neutrophil cumulation (129, 130). These alterations may be related, at least in part, to the non-reflow phenomenon, and b) *lethal myocardial reperfusion injury*, characterized by death and apoptosis of cardiomyocytes that were viable when reperfusion is applied (131, 132 <http://www.jci.org/articles/view/62874> - B2). Lethal myocardial reperfusion injury may account for up to 50% of the final myocardial infarction size, and this type of injuries attenuates the benefits of myocardial reperfusion, and

thus represents a target for cardioprotection. At present, no effective therapy exists for this situation. It has been estimated that timely (early) reperfusion can salvage approximately 50% of severely ischemic myocardial and that prevention of myocardial reperfusion injury could prevent the necrosis of an additional 40% (111).

Most of studies suggest that the major factors contribute to myocardial reperfusion injury are intracellular calcium overload, overproduction of radical oxygen species, abrupt restoration of pH in ischemic zone, and hipercontracture (9, 13, 111, 132). These phenomena have been involved in opening a channel in

the inner mitochondrial membrane (mitochondrial permeability transition pore), which permits the entry of calcium and radical oxygen species into mitochondria, leading to an energetic failure, and death and apoptosis of cardiomyocytes. Sarcolemmal disruption may be the feature that causes irreversibility, but its pathogenesis is at present unknown (9, 13, 111, 132). Figure 10 summarizes the main intracellular factors involved in the effects of ischemia and of reperfusion in the cardiomyocytes affected by coronary artery occlusion.

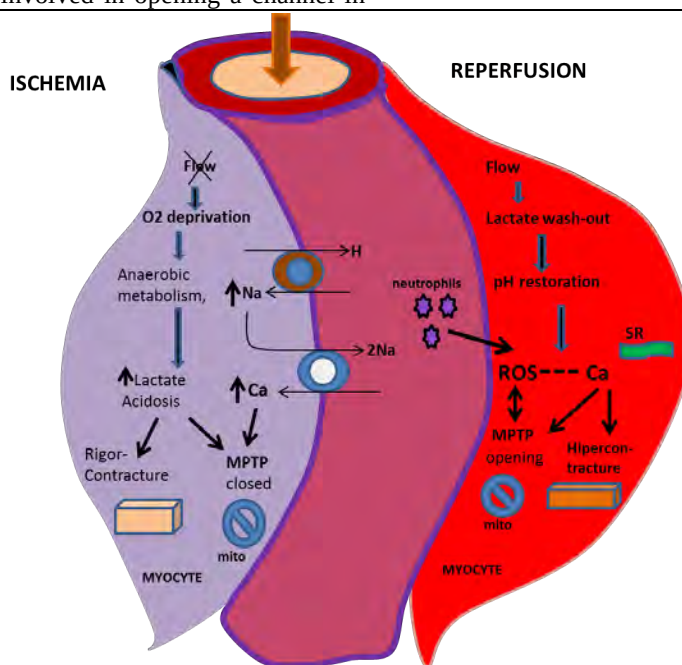


Figure 10. Schematic representation summarizing main intracellular changes that may occur in cardiomyocytes after interruption of blood supply to a zone of myocardium (Ischemia, left), and after restoration of blood supply to this myocardial ischemic zone (Reperfusion, right).

The available data indicate that not only cardiomyocytes but also the coronary vasculature (with its endothelium) is damaged after coronary ischemia-reperfusion. In this condition, the coronary circulation deserves attention because of it occupies a central position in the cause and consequences of ischemia-reperfusion, and it can be damaged in different degrees. This damage may vary from moderate impairment of endothelium function to severe both functional and structural alterations with edema of the vascular wall, and ultimately to vascular obstruction and the no-reflow phenomenon. These alterations are involved in dysregulation of coronary blood flow and functional ability of coronary collaterals, and therefore in evolution of ischemia-reperfusion and in pathophysiology of reperfusion injury. In consequence, the study of coronary vascular and endothelial function after ischemia-reperfusion is a focus of interest for investigators to understand pathophysiology of reperfusion injury, and to improve therapeutical strategies for this condition.

Several factors, including dysregulation of coronary function, increased coronary vascular resistance and

microvascular obstruction are detrimental for coronary perfusion after ischemia-reperfusion. Underlying these alterations may be disbalance between endothelial vasodilators and vasoconstrictors, coronary microembolization, inflammatory cell infiltration and post-ischemic hyperpermeability. The coronary endothelium is one of the victims of ischemia-reperfusion. Since the observation by D. D. Ku in 1982 (133) it is known that ischemia-reperfusion induces endothelial cell dysfunction, with impairment of endothelium-dependent coronary vasodilatation and augmented coronary reactivity to endothelium-modulated vasoconstrictors. Also, it seems to be that the endothelial function may be very sensitive to ischemia-reperfusion as it has been observed that after brief (15 min) ischemia, coronary vasodilator response to Ach was impaired during the first hour of reperfusion and gradually improved over a 90-minute, with no evidence of endothelium structural damage; in this same study, it was found that 20 and 30 minutes of ischemia completely impaired endothelium-dependent vasodilation, and induced endothelium structural damage (134). Many

subsequent studies have confirmed these observations, as brief periods of ischemia, including partial ischemia, impairs coronary vasodilator responses and enhances coronary vasoconstrictor responses, and that these alterations are accentuated after prolonged periods of ischemia accompanied by myocardial infarction, and they affect both epicardial and microvascular coronary functional ability (135-140). The mediators of the impairment in coronary vasomotor function after ischemia-reperfusion remain uncertain; it may be involved reactive oxygen species (138), plaque rupture with embolization of particulate debris and release of vasoconstrictors (serotonin, thromboxane (141, 142)), and inflammatory mediators, particularly TNF α (143, 144).

More recent studies support the idea that NO and ET-1 play a relevant role at various subclinical and clinical stages of the coronary artery disease, and particularly after myocardial ischemia-reperfusion. The NO/ET-1 axis could play an important role in pathophysiology of myocardial ischemia-reperfusion and of reperfusion injury, and beneficial effects of some therapeutical strategies for myocardial reperfusion injury are attributed to modification of this axis. This particular issue, however, remains to be resolved and the available results are contradictory. As NO and ET-1 may interact for regulating the function of coronary vasculature and the myocardium, the study of these two substances probably should be considered together. NO is produced by both coronary endothelial cells and cardiomyocytes, and the principal source of this NO is eNOS (NOS3); in cardiomyocytes NOS1 may be also involved, and expression of both NOS1 and NOS3 in these cells appears to be species-dependent (for this issue, see References 36, 145-148). On the other hand, NO seems to play a relevant role in the functional regulation of myocardium under normal conditions and after ischemia-reperfusion (36, 147-149). Several studies demonstrate that biosynthesis of NO by constitutive NOS (endogenous NO) plays a critical role in alleviating the severity of myocardial ischemia-reperfusion as well as reperfusion injury. NO has been known to play various functional and pathological roles as an intracellular or intercellular messenger in the heart, and there are data indicating that NO can both reduce and mediate myocardial reperfusion injury. NO influences myocardial perfusion by regulating coronary vascular function, causing a direct vasodilatory effect and modulating vascular reactivity to other types of vasoactive stimuli (e. g. ET-1). NO can also influence indirectly myocardial perfusion by regulating leukocyte-endothelial cell interaction, inhibiting platelet adhesion and aggregation, attenuating smooth muscle cell proliferation, and possible modulation of cardiomyocytes function. NO released from the endothelium has also been shown to inhibit surface expression of many endothelial cell adhesion molecules (ECAMs), including P-selectin, E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 (for this issue, see Reference 147). Also, as cardiomyocytes are surrounded by capillary endothelial cells it allows for cell-to-cell signaling between these two

types of cells. Interactions between endothelial cells and cardiomyocytes could be of significance in regulating cardiac function by modulating vascular tone and by stimulating proliferation of neighboring cells. This aspect may be of relevance in situations such as ischemia and reperfusion (149).

There are studies showing that NO may be detrimental, and also studies showing that NO may be critical to preserve cardiomyocytes function and viability after ischemia-reperfusion. In a Review published by R. Bolli in 2001 it is indicated that "Of the 92 studies that have examined the role of NO in modulating the severity of ischemia-reperfusion injury in unstressed myocardium, the vast majority (73%) have concluded that NO (either endogenous or exogenous) has a protective effect, and only 12% found a detrimental effect. The proportion of studies supporting a cytoprotective role of NO is similar for in vivo and in vitro preparations" (150). The cardiac interstitial NO concentration may increase during early ischemia and early reperfusion, and this increase may be in part derived from activated NOS isoforms but also from NOS-independent pathways. The cardiac interstitial NO concentration is within the nanomolar range during normal perfusion. And during ischemia, NOS3 activity is increased within minutes, and subsequently the NO concentration during early ischemia is increased (151). However, with prolonged myocardial ischemia, NOS3 protein expression decreases, and the tissue acidosis attenuates NOS3 activity (153). Within the early seconds of reperfusion, the NO concentration is increased (154), and if reperfusion is prolonged, NOS activity and thus NO concentration decrease below baseline values (155). Decreased NO production during reperfusion have been suggested by observations indicating loss of NO-dependent vasodilation in response to ACh or bradykinin, or loss of vasoconstriction in response to NOS inhibition (for details, see Reference 146). During myocardial ischemia-reperfusion, reduced production of endogenous NO could leave unopposed coronary vasoconstriction to the presence of vasoconstrictors such as ET-1. This disbalance between NO and ET-1 in turn enhances vascular tone, decreases coronary blood flow and exacerbates reperfusion injury.

From the results obtained in a study performed in rat hearts, it is suggested that during reperfusion, cardiac function is depressed, despite increased rather than decreased endogenous NO production, largely due to the prevalence of the deleterious effects of ET-1. These adverse effects of ET-1 can be overcome by antagonism of ET-1 receptors or exogenous NO supplied by NO donors (156). In other study performed in anesthetized pigs (157), it was examined the interaction between the cardioprotective effect of endothelin receptor blockade and NO during ischemia-reperfusion injury. The authors of this study suggest that blockade of endothelin ETA receptors produces cardioprotective effects, and that this cardioprotection is mediated via a mechanism related to NO (157).

In a Review published by R. Schulz et al. in 2004 (146), the authors remark the importance of endogenous and exogenous NO when given at the time of reperfusion for vascular and myocardial function, and morphological outcome following ischemia-reperfusion. Administration of NO, NO donors or drugs that enhance NO release (statins, calcium antagonists, angiotensin-converting-enzyme-inhibitors, dexamethasone) prior to ischemia protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. This exogenous administration of NO prior to ischemia can initiate a preconditioning-like phenomenon. Interestingly, in this study it is suggested that endogenous NO derived from NO-synthase is not involved in triggering or mediating the early phase of ischemic preconditioning's protection, but it does play a pivotal role for initiating and mediating the delayed phase of ischemic preconditioning's protection (146).

The variation in plasma levels of several factors, including ET-1 and NO, was examined in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion (158). Rabbits were exposed to open-chest surgery and were separated in three groups: group A received sham-surgery, group B was the reperfusion group, and group C was the infarction group. At 12 h and at 24 h after chest closure, plasma levels of ET-1 in groups B and C were higher than before chest surgery, and at 24 h there was no significant difference between these two groups. NO levels in groups B and C at 12 h after chest closure were decreased compared to those before chest surgery. NO levels in group B at 24, 48, and 72 h were lower than those at 12 h, while those of group C were not significantly changed after 12 h. These results show that ET-1 and NO are mutually antagonistic vasoactive substances, and that after myocardial ischemia-reperfusion, sustained reduction of NO may occur, thus suggesting that NO supplement is a good clinical choice. Dynamic monitoring and comparison of plasma levels of ET-1 and NO, as well as of other factors, revealed that appropriate intervention of these factors may reduce reperfusion injury. The authors of this same study suggest that plasma ET-1 levels may be used as a reference index for the diagnosis and determining the prognosis of myocardial infarction. It seems to be that endogenous ET-1 is increasingly released in systemic circulation and coronary circulation, mainly in an autocrine/paracrine manner by endothelial cells. This study of Zhao et al. (158) also showed that 12 h after myocardial ischemia, plasma ET-1 levels increased, while calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels decreased. Various factors and metabolites produced during the early phase may have a stimulating effect on endothelial cells, increasing the synthesis and release of ET-1, and leading to both the consumption and the decreased levels of CGRP. From this study (158) it can be inferred that NO mediates reperfusion injury, but it also may reduce reperfusion injury through its antagonism on the effects of ET-1. However, this particular issue requires further investigation.

With regard to mechanisms underlying the effects of NO after ischemia-reperfusion, several hypothesis have been proposed. In relation to the possible protective role of NO during ischemia-reperfusion, it has been proposed that it is related to the anti-peroxidation effect (156), as well as to resistance towards neutrophil adhesion and aggregation (159). In relation to NO-mediated myocardial injury, it has been suggested that it may be primarily related to generation of large amounts of oxygen free radicals as consequence of an excess of NO, which reacts rapidly with oxygen (154). These circumstances may lead to reperfusion injury and aggravate the condition (160). A study carried out in cultured cardiomyocytes suggests that the enhanced production of NO was critical in balancing ATP supply and demand during ischemia, and also in protecting cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury (161).

The development of gene-targeted mice has allowed to begin to define the cellular and molecular mechanisms involved in the pathogenesis of acute myocardial infarction, although the results from these experimental models should be taken with caution. The development of mice with genetic manipulations could provide useful information regarding pathologic mechanisms related to myocardial ischemia-reperfusion injury (for details, see Reference 147). Studies using a model of eNOS transgenic mice have demonstrated that eNOS overexpression significantly attenuates the extent of myocardial infarct size following coronary artery ischemia and reperfusion (162).

Summarizing, the studies exposed before suggest that the role of NO in ischemia-reperfusion and reperfusion injury is not clear as there are data suggesting that NO may be beneficial and that it may be detrimental in evolution of myocardial ischemia-reperfusion. As hypothesis, it might be that at the beginning of reperfusion the presence of NO might be beneficial, particularly for coronary vascular vasomotion, but at chronic stage its presence might be pernicious for heart tissue because of it would facilitate formation of free radical species.

With regard to ET-1, many data suggest that this peptide is involved in the pathophysiology of reperfusion injury (67, 68, 163-166), and that it may be also a significant predictor of reperfusion injury (167, 168). During ischemia-reperfusion, the production of ET-1 is increased, the coronary vasoconstrictor effects of this peptide are also increased, and ET-1 enhances myocardial necrosis and arrhythmogenesis (67, 68, 80). Plasma ET-1 levels increase 3-4h after the onset of ST segment elevation myocardial infarction, peak within the first 24h and remain elevated after 48h (168). High ET-1 values after percutaneous coronary intervention have been linked to poor prognosis, including higher 30-day mortality (168). In humans, evidence of microvascular injury has been obtained as angiographic scores, primarily by indirect methods such as the thrombolysis in myocardial infarction grade flow and myocardial blush grade (169) and more recently by cardiac magnetic resonance (170). Results

from patients suggest that high plasma ET-1 levels after myocardial infarction are associated with the presence of microvascular obstruction and lower myocardial salvage index (171).

An interesting study was performed in patients with AMI that underwent reperfusion therapy or conservative drug therapy. Patients who underwent reperfusion therapy had significantly lower eNOS and NO levels, and higher plasma ET-1 levels than those who received conservative drug therapy. All patient groups had significantly lower eNOS and NO levels, and higher ET-1 levels, than healthy controls. There was a significant positive correlation between eNOS and NO, as well as significant negative correlations between eNOS/ET-1 and NO/ET-1 (172). In other study it has been found that the circulating level of ET-1 was considerably higher in the non-spontaneous reperfusion patients than in the spontaneous reperfusion patients; the ET-1 level was the only significant predictor

of spontaneous reperfusion, and the ET-1 level at admission is an indicator of spontaneous reperfusion (173). L. Cao et al. (174), after considering observations by others, suggest that ET-1 may act as a negative factor in reperfusion injury. These authors also suggest that ET-1 plays a different role in the different stages of myocardial ischemia-reperfusion, and to ascertain the exact mechanisms, experimental and clinical studies are needed (174). On the other hand, it can not be excluded that after ischemia-reperfusion, ET-1 also may induce beneficial effects on the myocardium. ET-1 could induce cardioprotection against infarct size and ventricular arrhythmias, through as yet incompletely understood mechanisms (175), as well subsequent infarct-healing and early ventricular remodeling (166, 176).

Data from literature suggest that ET-1 plays a relevant role in development of coronary artery disease and in the effects of myocardial ischemia-reperfusion (Figure 11).

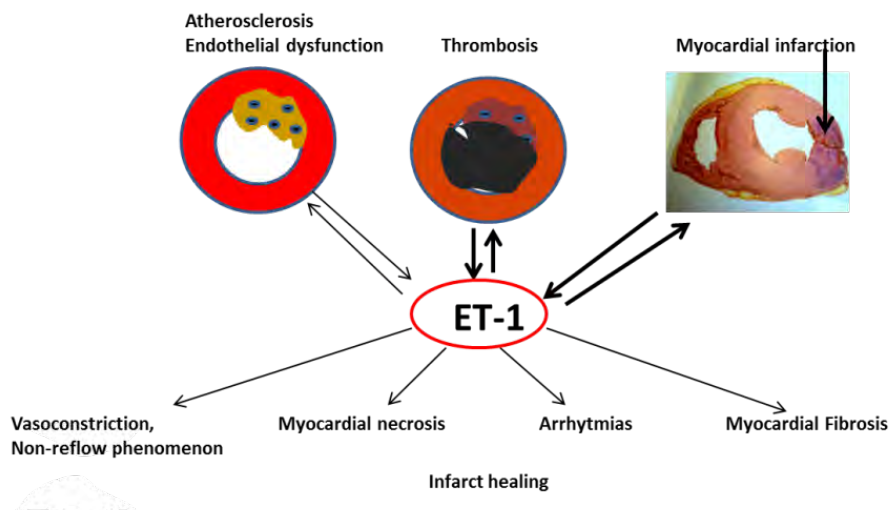


Figure 11. Schematic representation of the probable role of ET-1 in the pathophysiology of coronary artery disease, myocardial infarction, and heart failure. At preclinical stages, ET-1 could contribute to endothelial cell dysfunction and to atherosclerosis. During acute coronary syndromes, ET-1 could cause adverse effects (vasoconstriction, inflammation, myocardial necrosis, arrhythmogenesis), and during chronic evolution it might have beneficial effects by participating in infarct healing.

The study of the effects of ET-1 and its interaction with NO in coronary vasculature after ischemia-reperfusion may contribute to know its pathophysiology. Respect to this issue, most of studies have been related with the analysis of the effects of total ischemia followed by reperfusion, and very few studies have been performed about the effects of partial ischemia alone or followed by reperfusion. The clinical situation of partial ischemia of the myocardium may be present in patients with coronary atheromatosis, dynamic vasospasm, or transient arterial hypotension.

During reperfusion after total (134) or partial (140) coronary occlusion, endothelium-dependent coronary vasodilatation is decreased. Also, basal release of NO from isolated, perfused rat hearts may be diminished after global ischemia-reperfusion, with implication of the NO pathway (177). On the hand, administrations of exogenous NO

diminish the adverse effects of ischemia-reperfusion (178). Other studies, however, showed that inhibitions of NO synthesis may protect, rather than aggravate, the effects of ischemia-reperfusion (18, 179). For ET-1, ischemia-reperfusion can induce increased coronary vasoconstriction in response to this peptide (180) but whether or not this increased effect is present may depend on the severity and duration of ischemia (181). The increased response to ET-1 after ischemia-reperfusion it has been attributed to decreased production of NO and prostacyclin as a result of endothelial dysfunction, and of changes in characteristics of endothelin receptors in coronary vessels (180, 182). The coronary reactivity to ET-1 after ischemia-reperfusion has been explored mainly using in vivo and in vitro preparations, and coronary ischemia for different periods has been induced in vivo by occluding one coronary artery and in isolated, perfused hearts.

In our laboratory, we found in anesthetized goats that during partial occlusion of the left circumflex coronary artery, coronary vascular conductance was reduced by about 30%, and the coronary vasodilatation in response to Ach and sodium nitroprusside was decreased in animals non-treated or treated with L-NAME or with meclofenamate; the vasoconstriction in response to ET-1 was depressed in non-treated animals, and this depression was reversed by L-NAME and was accentuated by meclofenamate. At 30 min of reperfusion after this partial coronary occlusion, coronary vascular conductance remained decreased by about 25%, and the vasodilatation in response to Ach and sodium nitroprusside, as well as the vasoconstriction with ET-1 were as in the control and were comparable in treated and non-treated animals. These results suggest: a) that during partial ischemia, the coronary vasodilator reserve is greatly reduced, and the vasoconstriction to ET-1 is blunted, with preservation of the modulatory role of NO and involvement of vasoconstrictor prostanoids in this vasoconstriction, and 2) that during its reperfusion, the coronary vasodilator reserve and the coronary reactivity to Ach and ET-1 recover, but the modulatory role of NO in this reactivity may be attenuated (183).

We also explored the effects of reperfusion after short and prolonged, total ischemia on the role of NO and the

effects of ET-1 in the coronary circulation. In this case, 15- or 60-min total occlusion of the left circumflex coronary artery was induced in anesthetized goats. In non-treated animals, during reperfusion after 15-min occlusion, the ET-1-induced coronary effects were lightly increased, and the effects of Ach were unchanged. During reperfusion after 60-min occlusion, the ET-1-induced effects were more pronounced, and the effects of Ach were decreased. L-NAME treatment did not modify the coronary effects of ET-1 during reperfusion after both occlusion durations. This treatment inhibited the effects of Ach during reperfusion after 15-min, and after 60-min occlusions. Meclofenamate treatment did not modify the coronary effects of ET-1 and Ach during reperfusion after both occlusion durations. Thus, ischemia-reperfusion could increase the coronary response to ET-1, which is more pronounced during reperfusion after prolonged than after brief ischemia, and that this increased response to ET-1 is probably related to inhibition of NO release, without involvement of prostanoids (184). Figure 12 shows an estimation of the role played by NO in the regulation of the coronary circulation under normal conditions and after ischemia-reperfusion (183, 184).

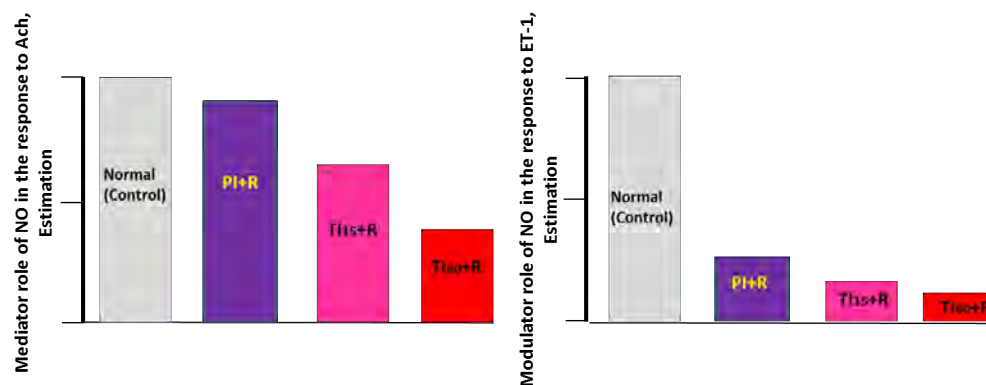


Figure 12. Estimation of the role played by NO in the regulation of the coronary circulation under normal conditions, after partial coronary occlusion followed by reperfusion (PI+R), after 15 min of total coronary occlusion followed by reperfusion (TI15+R) and after 60 min of total coronary occlusion followed by reperfusion (TI60+R). These estimations are based on data obtained in experiments with Ach and ET-1 in anesthetized goats (References 183, 184).

To compare the coronary response to ET-1 with the response to other vasoconstrictor after ischemia-reperfusion, we explored the coronary effects of arginine-vasopressin (AVP). This hormone may be of significance in the regulation of coronary circulation as it can produce coronary vasoconstriction (185), which can be severe enough to cause myocardial ischemia (186). This peptide also could be of interest for understanding the pathophysiology of myocardial ischemia-reperfusion as

human plasma levels of AVP are augmented after myocardial infarction (187), and during reperfusion after myocardial infarction (188). Studies performed in dogs show that the coronary effects of AVP are increased in the ischemic myocardium, which can worsen hypoperfusion of collateral-dependent myocardium during exercise (189). Sellke and Quillen (190) report that the coronary action of AVP is augmented after ischemia alone or followed by reperfusion, and the authors suggest that this augmented

effect might be related to alteration of release of NO and prostanoids.

In pages 26 and 27, we have commented two studies from our laboratory where we found that under normal conditions AVP produces marked coronary vasoconstriction and that this vasoconstriction may be mainly mediated by vasopressin V1 receptors, and it is modulated by NO, but not by prostanoids (98). In the other study, we compared the coronary effects of ET-1 and AVP, and the results show that ET-1 produce higher vasoconstrictor effect than AVP. From this study, it is also suggested that NO may play a more relevant role for modulating the coronary vasoconstriction by ET-1 than by AVP, and that cyclooxygenase products may not be involved in the coronary effects of these two peptides (100) (See Figure 7). We then examined the coronary effects of AVP and its interaction with NO and prostanoids during ischemia and reperfusion. During partial coronary occlusion, the coronary vasoconstriction in response to AVP was attenuated in non-treated animals, and this attenuation was reversed by L-NAME and was accentuated by meclofenamate. At 30 min of reperfusion after this partial coronary occlusion, the vasoconstriction with AVP was as in the control and this vasoconstriction was not affected by L-NAME or meclofenamate. These results suggest that: 1) during partial ischemia, the coronary vasoconstriction with AVP is attenuated, with preservation of the modulatory role of NO and probable involvement of vasoconstrictor prostanoids in this vasoconstriction; and 2) during its reperfusion, the coronary reactivity to AVP recover, but the modulatory role of NO in this reactivity may be attenuated. The significance of these results may be that the endothelial function in modulating coronary reactivity to AVP is very sensitive to reperfusion after partial, moderate ischemia, and that AVP may also contribute to the adverse effects of ischemia-reperfusion on coronary vasculature (191). In other series of experiments, we found that at 60 min of reperfusion after 15 min total occlusion of the circumflex coronary artery, the coronary vasoconstriction in response to AVP was increased during reperfusion in non-treated, was not changed in L-NAME-treated and was decreased in meclofenamate-treated animals. Therefore, this study suggests that during reperfusion after a short, total ischemia, the coronary vasoconstriction in response to AVP is increased, probably due to both attenuation of the modulatory role of NO and the release of vasoconstrictor prostanoids (192). This idea is in line with that proposed by others (189, 190), and both of them suggest that AVP should be considered as a factor involved in pathophysiology of myocardial ischemia-reperfusion, although its role could be of less significance than that of ET-1.

We also explored the coronary vasodilator reserve after ischemia-reperfusion examining the hyperemic response after brief coronary occlusions. To this, partial (60 min) or total (15 and 60 min) occlusions of the left circumflex coronary artery were induced, followed in each case by 60-

min reperfusion in anesthetized goats, untreated and treated with L-NAME or meclofenamate. Coronary occlusions of 5- and 10-s duration produced hyperemic responses that depended on occlusion duration. After ischemia-reperfusion, these hyperemic responses were diminished, and this diminution was dependent on duration and severity of ischemia. These effects of ischemia-reperfusion were not affected by inhibition of NO synthesis with L-NAME, and were reversed with meclofenamate. The hyperemic response reduction during reperfusion after prolonged ischemia, but not after brief ischemia may be related at least in part to increased production of vasoconstrictor prostanoids (193).

Episodes of myocardial ischemia may occur in humans under situations such as transient arterial hypotension. From experiments in anesthetized dogs it has been reported that the coronary reactivity to ET-1, but not to angiotensin II is increased during low coronary perfusion pressure, which may contribute to coronary ischemia after reduced coronary perfusion (194), and that ET-1 does not modify the coronary response to decreased coronary perfusion pressure after coronary stenosis (195). Hemorrhagic shock in rats is accompanied by decreased perfusion of the heart (and other organs), together with increased ET-1 levels in plasma (196). As a result, the authors suggest that ET-1 is involved in the decreased perfusion of vital and peripheral tissues during hemorrhagic shock (196). Experimental observations have shown that ET-1 (197) and AVP (187) may increase in plasma during some types of hypotension. It seems that under normotension NO may be more relevant in modulating coronary vasoconstriction by ET-1 than by AVP (191), and that NO and ET-1 mutually affect the production and action of each other in the blood vessel wall (198). We performed experiments in anesthetized goats where blood flow through the left circumflex coronary artery was measured electromagnetically, and hypotension was induced by constriction of the caudal vena cava. ET-1 and AVP were directly injected into this coronary artery before (normotension) and during hypotension in animals non-treated and treated with L-NAME, meclofenamate, or both inhibitors. The results of these experiments suggest that hypotension increases the coronary vasoconstriction in response to ET-1 but not to AVP. This increased response to ET-1 may be related to both inhibition of NO release and of vasoconstrictor prostanoids release. This study also suggests that in the coronary circulation, the functional interaction between NO and ET-1 may be greater than that between NO and AVP (199).

To extend our knowledge of the coronary effects of ET-1 after ischemia-reperfusion, the left anterior descending coronary artery of anesthetized pigs was subjected to 30-min occlusion followed by 60-min reperfusion. Then, rings distal (ischemic arteries) and proximal (control arteries) to the artery occlusion were taken from this artery and prepared for isometric tension recording. The sensitivity of the contractile response to

ET-1 and to the endothelin ETB receptor agonist IRL-1620 was augmented in ischemic vessels. The endothelin ETA receptor antagonist BQ-123 decreased the sensitivity of the response to ET-1 similarly in ischemic and control arteries. The endothelin ETB receptor antagonist BQ-788, endothelium removal or L-NAME potentiated the response to ET-1 and to IRL-1620 in control arteries but not in ischemic arteries. Meclofenamate augmented the maximal response to ET-1 in control arteries, and reduced it in ischemic arteries. In precontracted arteries, IRL-1620 relaxed control but not ischemic arteries, and L-NAME or meclofenamate abolished this relaxation. Therefore, ischemia-reperfusion increases the coronary vasoconstriction in response to ET-1 probably due to impairment of endothelin ETB receptor-induced release of NO and prostacyclin, to augmentation of the contractile response to activation of endothelin ETB receptors, and to increased release of vasoconstrictor prostanoids (200). Studies by others were performed in male Sprague-Dawley rats, which were subjected to either heart ischemia-reperfusion (15 min ischemia and 22 h reperfusion), permanent ischemia (22 h) by ligation of the left anterior descending coronary artery, or sham operation (201). Then, the endothelin receptor subtypes mediating vasoconstriction were examined in isolated segments of the left anterior descending and the non-ligated septal coronary arteries. Endothelin ETB receptor-mediated vasoconstriction and receptor protein levels were augmented in coronary arteries exposed to ischemia-reperfusion. In contrast, the ETA receptor-mediated vasoconstriction was unaltered in all groups. It is suggested that ischemia-reperfusion induces local up-regulation of ETB receptors in the smooth muscle cells of coronary arteries in the post-ischemic area. In contrast, in non-ischemic areas, endothelin ETB receptor function was unaltered (201). In a revision published in 2010, Nguyen et al. (80) suggest that the beneficial role of endothelin ETB receptors present under normal conditions may decline with age and risk factors for cardiovascular diseases, revealing smooth muscle ETB-receptors with pro constricting and proinflammatory activities.

We also studied the effects of ischemia-reperfusion on coronary vasculature using isolated, perfused hearts from rats. After 15, 30 or 45 min of global zero-flow ischemia and 15 min reperfusion, the coronary vasoconstriction induced by ET-1 increased after 15 min of ischemia, but not after 30 or 45 min of ischemia. Inhibition of NO synthesis with L-NAME augmented the vasoconstriction induced by ET-1 in non-ischemic hearts, but not following ischemia. These results suggest that in this experimental preparation, ischemia-reperfusion also inhibits NO production, causing an increased coronary response to ET-1 after brief ischemias. Longer ischemias may non-specifically inhibit coronary vasoconstriction and reduce NO production (202). In other series of experiments carried out in isolated, perfused hearts from rats exposed to 30 min global zero-flow ischemia followed by 15 min reperfusion (203), we found that after ischemia-

reperfusion, 5-hydroxytryptamine produced contraction in isolated coronary arteries, which was potentiated by treatment with ET-1. This potentiation by ET-1 was lower after ischemia-reperfusion than after control, and the potentiation was reduced by L-NAME, by blockade of endothelin ETA receptors with BQ123 and by blockade of endothelin ETB receptors with BQ788, but not by the cyclooxygenase inhibitor meclofenamate. Thus, ET-1 at low concentrations could potentiate coronary vasoconstriction, and this effect is reduced after ischemia-reperfusion, mediated by both endothelin ETA and ETB receptors and is dependent on NO release. This suggests that ischemia-reperfusion might induce complex effects on the coronary vascular effects of ET-1 (203).

We have also explored the effects of ischemia-reperfusion on the coronary reactivity to other types of substances, the effects of which may be dependent on the endothelium and may be of interest in the context of ischemia-reperfusion. Between these substances are diadenosine polyphosphates (ApnAs), which are molecules that have a chain of 2-6 phosphate groups and they may produce vasodilatation or vasoconstriction of blood vessels depending on the particular ApnA in question. In the coronary circulation, ApnAs produce vasodilation in pigs (204) and in dogs (205) when they are present at nM to mM concentrations, as may exist in plasma under normal conditions. Platelet activation and platelet release of ApnAs, may be involved in the pathophysiology of ischemia-reperfusion (206), and the concentration of ApnAs may increase in coronary venous blood during ischemia-reperfusion (207). As these substances can produce vasodilatation or vasoconstriction depending on the conditions of coronary blood vessels, these compounds could participate in the altered coronary regulation associated with ischemia-reperfusion. Apn5A has a long phosphate chain and it is more likely to produce vasoconstriction and therefore, to be involved in the coronary vasoconstriction that frequently occurs after ischemia-reperfusion. Moreover, the production of Ap5A in the heart is increased during heart ischemia. Compared to control rat hearts, the coronary vasoconstriction to Ap5A was augmented and vasodilation diminished after ischemia-reperfusion. After testing the effects of antagonists for P2 and P2Y purinoceptors, L-NAME and meclofenamate, it is suggested that ischemia-reperfusion reduces the coronary vasodilatory response and increases the coronary vasoconstriction to Ap5A, due to a reduced influence of purinergic P2Y receptors and/or to the production of vasoconstrictor prostanoids (208). The studies with triphosphate (Ap3A) showed that this substance produces coronary vasodilation in control rat hearts, which was attenuated following ischemia-reperfusion. In this case, the results suggest that the attenuation of the coronary vasodilatation to Ap3A after ischemia-reperfusion could be due to the functional impairment of purinergic P2Y receptors and K (ATP) channels, and/or reduced NO release in this condition (209). Tetratraphosphate (Ap4A), in control rat hearts,

produced vasodilatation, which was reduced by reactive blue 2, glibenclamide, and endothelin-1, but was not affected by L-NAME. After ischemia-reperfusion, the vasodilatation to Ap4A diminished, and in this case the relaxation to Ap4A was not modified by reactive blue 2, L-NAME, glibenclamide, although it was reduced by endothelin-1. These results suggest that the reduction of the coronary relaxation to Ap4A after ischemia-reperfusion may be due to impaired effects of KATP channels and to reduced response of purinergic P2Y receptors (210). These three studies (208-210) also show data suggesting that purinergic receptors may be a way involved in the coronary response to some vasoactive substances and this way may be altered after ischemia-reperfusion. Interestingly, purinergic receptors may be also involved in the coronary vasodilatation in response to Ach after ischemia-reperfusion, but not under control conditions. The role of purinergic receptors in the coronary vasodilation in response to Ach may be developed in coronary vasculature during ischemia-condition in order to compensate the reduction of NO release in this condition (211).

Summarizing, the data exposed before suggest that ischemia-reperfusion alters the regulation of the coronary circulation, which may be induced, in part, by dysfunction/damage of the endothelium. This alteration could lead to modification of the normal balance between NO and ET-1 that exists under normal conditions for the control of coronary vascular tone. After ischemia-reperfusion, the role of NO is reduced, whereas that of ET-1 is augmented, which may have pernicious effects for the functional capacity of coronary vasculature, as for example this vasculature could exhibit an exaggerated vasoconstrictor and inflammatory response, thus contributing to the presence of the non-reflow phenomenon. Therefore, the damage of the endothelium, with the consequent alteration in the interaction between NO and ET-1 may play a crucial role in pathophysiology of dysregulation of coronary circulation and of the non-reflow phenomenon after ischemia-reperfusion, and in pathophysiology of reperfusion injury. Also, these two substances by forming a functional axis that acts on the coronary artery wall, probably should be considered together in analyzing pathophysiology of myocardial ischemia-reperfusion and reperfusion injury, as well as in therapeutical approaches for mitigating reperfusion injury.

4. THERAPEUTICAL APPROACHES FOR REPERFUSION INJURY

In an elegant article, E. Braunwald published that during the last 100 years, approximately, the management of AMI has gone through fourth major phases (9). These phases are summarized as follows: The past: a) phase I: the management was limited to bed rest, morphine for pain, as well as digitalis, caloric and fluid restriction, and expectant treatment; b) phase 2: it began in 1961 with a paper by Desmond Julian, where he described what later would be known as the Coronary Care Unit (212). In these Units the

patients were monitorized, and they were attendant by training of medical and nursing staff, providing trained nurses with the authority and responsibility to perform this procedure, including external defibrillation, in the absence of a physician. Phase 3 (*The Present*): It is the phase of myocardial reperfusion which was initiated in 1975 by Chazov et al. who lysed coronary thrombi by infusing streptokinase directly into the blocked coronary arteries of patients with AMI (6), and it was demonstrated that timely reperfusion actually salvaged ischemic myocardium (213). During the last quarter century, myocardial reperfusion has been improved progressively by a number of key steps. However, although myocardial reperfusion represents a major advance in the treatment of myocardial infarction, this procedure is often accompanied by myocardial injury, so that E. Braunwald and R. A. Kloner referred to myocardial reperfusion as 'a double-edged sword' (10). Phase 4 (*The Future*): the prevention of myocardial reperfusion injury. Many interventions to prevent or diminish myocardial reperfusion injury have been studied (214). It has been estimated that timely, adequate reperfusion can salvage approximately 50% of severely ischemic myocardium (215), and that prevention of myocardial reperfusion injury should prevent the necrosis of an additional 40% (112). Nevertheless, further experimental and clinical research on myocardial reperfusion injury should be carried out (9).

The prognosis of AMI largely depends on its extent, and the final necrotic extent is mostly due to the speed of the progression of ischemic injury and the duration of the ischemia (215, 216). The most effective treatment to limit infarct size is early reperfusion, and the window in which reperfusion effectively limits infarct size in patients with ST segment elevation myocardial infarction is short. After 3 h of ischemia, without collateral circulation and residual flow, the amount of salvaged myocardium is small or nonexistent (217). Nonetheless, late reperfusion may be also beneficial, and should generally be performed within 12 h of symptoms onset (218). In this case, however, the benefit is due to the positive effects of reperfusion on healing of myocardium damaged (218).

Protect patients against myocardial damage caused by ischemia-reperfusion has become a public health problem. Because the best strategies against the morbidity and mortality of AMI is to minimize the ischemic death of myocardial tissue, there are a notable interest for investigating and learning how the heart can be protected from ischemic death. The development of new approaches, including new techniques, as well as the discovery of novel drugs could provide means for new ways of heart protection against ischemic myocardial injury. About this particular issue, several and revisions are available (9, 122-124, 217-220).

A number of therapeutic strategies for preventing myocardial reperfusion injury have been developed. In general, they can be grouped in two ways: a) non-pharmacological strategies (conditioning phenomena: ischemic preconditioning (IPC), ischemic postconditioning

(IPOC), and remote ischemic preconditioning (RIPC)); and b) pharmacological strategies (use of drugs).

4.1. Conditioning phenomena

IPC: Observations showed that reperfusion salvages ischemic myocardium from infarction, and that infarction spreads in a wave front during ongoing ischemia but leaves salvageable myocardium up 2-3 hours. Then, Murry et al. in 1986 came up with the ingenious idea to perform short cycles of ischemia-reperfusion before a prolonged ischemic insult and found that this maneuver attenuated myocardial infarct size (221), thus establishing the prime cardioprotective paradigm of IPC. Further studies showed that IPC has two different temporal forms: an acute form which confers immediate protection but vanishes after an interval of about 2 hours between the preconditioning stimulus and the event that need protection, and a delayed form which reappears after 24-48 hours, lasts longer but is less protective (222). The acute form of IPC relies on the recruitment of acutely available signaling modules, whereas the delayed form involved increase expression of protective proteins in response to an acute signal (223). IPC has been translated to human beings with ischemic heart disease but because of its nature it can not be used on patients with AMI, and it can be used only in situations as percutaneous coronary interventions and coronary artery bypass grafting (220, 224).

Protection of coronary vascular function by IPC is uncertain as there are results indicating that this procedure preserves coronary vasomotion, whereas other results do not (see Reference 14).

IPOC: Modification of reperfusion can attenuate reperfusion injury and thus reduce infarct size. This procedure refers to intermittent reperfusion of the acute ischemic myocardium, which has been reported to prevent myocardial reperfusion injury and reduce myocardial infarction size by 40%–50% (122). IPOC was established by Z. Q. Zhao et al. (225) who experimentally observed that 3 cycles of 30 sec reperfusion/30 sec reocclusion at the immediate onset of reperfusion after 60 min of coronary occlusion reduced infarct size to a similar amount that with IPC. This seminal study was followed by others. IPOC is limited to the early minutes of reperfusion, and it has been successfully translated to human beings with ischemic heart disease, and can be used in patients undergoing interventional reperfusion of AMI (224). Staat et al. (226) first applied IPOC to the clinical setting of percutaneous coronary artery: immediately after direct stenting, coronary blood reflow was allowed for 60 seconds, following which the angioplasty balloon was inflated upstream of the stent for 60 seconds to occlude coronary blood flow, and this cycle was repeated 4 times in total. The results of this study confirmed the existence of lethal myocardial reperfusion injury in humans (227), but a number of clinical studies have subsequently confirmed the beneficial effects of IPOC, although not all studies have had positive results. Protector effects of IPOC on

coronary vasculature functionary unclear (see Reference 14).

RIPC: IPOC requires an invasive therapeutic intervention applied directly to the heart. However, the heart can be protected against acute ischemia-reperfusion injury from a distance, by applying one or more cycles of brief, nonlethal ischemia and reperfusion to another organ or tissue, a phenomenon that has been termed remote ischemic conditioning (RIPC) (228). In the clinical setting, RIPC has been achieved noninvasively by simply inflating and deflating a blood pressure cuff placed on the upper arm to induce three 5-minute cycles of ischemia and reperfusion (229). This therapeutic approach has been reported to be beneficial in patients undergoing cardiac surgery and in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. More recently, Botker et al. (230) demonstrated that RIPC applied by a paramedic to patients with ST segment elevated myocardial infarction in transit to the percutaneous coronary interventions center improved myocardial salvage compared with control patients. A recent review and meta-analysis of clinical studies shows that RIPC could be an effective method for reducing myocardial ischemia-reperfusion injury (231).

These conditioning procedures exert significant cardioprotection, but they may be injurious per se, and a better understanding of the signal transduction underlying the conditioning phenomena may help to make more beneficial the application of these techniques. A review about signaling molecules and mechanisms in conditioning (physical and chemical triggers, intracellular signal transduction) can be found in References 220 and 232. Cardioprotective signal transduction appears as a highly concerted spatiotemporal program, and the general consensus is that mitochondria are the most important effector of protection of conditioning, where most of signaling pathways may converge (220, 232). Although the translation of IPC and RIPC protocols to patients with acute myocardial infarction has been fairly successful, the pharmacological recruitment of cardioprotective signaling has been largely disappointing to date.

4.2. Pharmacological strategies

Several studies to prevent reperfusion injury by means of pharmacological agents have been conducted. Factors of importance are the timing of drug administration, animal species used, degree of collateral flow and the duration of ischemia. A variety of pharmacological compounds have been investigated in different experimental models of myocardial ischemia and reperfusion.

Considering the factors that may contribute to the deleterious effects of myocardial ischemia-reperfusion, pharmacological strategies tested are summarized as follows:

A) Against oxidative stress. Within a few minutes of myocardial reperfusion, a burst of oxidative stress (233) is produced by a variety of sources. This oxidative stress mediates myocardial injury and cardiomyocyte death through a number of different mechanisms. Based on these

observations, antioxidant therapy was considered to be an appropriate option to prevent such injury. However, both experimental and clinical studies have reported mixed results with the administration of antioxidant therapy at the onset of myocardial reperfusion (234). However, the discovery of mitochondrial-specific antioxidants may be more effective (235).

B) Against intracellular Ca^{2+} overload. Ca^{2+} overload begins during acute myocardial ischemia and is exacerbated during myocardial reperfusion, and this overload induces the opening of the mitochondrial permeability transition pore. Experimental studies have shown that pharmacologic antagonists of the sarcolemmal Ca^{2+} channel (236) or the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (237) administered at the onset of myocardial reperfusion, reduces infarct size by up to 50%. However, not all experimental studies using this therapeutic strategy have been positive. Clinical studies of Ca^{2+} channel blockers administered at the onset of myocardial reperfusion have not shown beneficial results (238). The identification of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter may result in the discovery of a new class of specific inhibitors for targeting lethal myocardial reperfusion injury.

C) To slow the restoration of physiological pH. During acute myocardial ischemia the intracellular pH decreases to <7.0 , where as at reperfusion, physiological pH is rapidly restored by the washout of lactate and the activation of the $\text{Na}^{+}\text{-H}^{+}$ exchanger, as well as the $\text{Na}^{+}\text{-HCO}_3^{-}$ symporter. This pH shift contributes to the cardiomyocyte death of lethal myocardial reperfusion injury by permitting mitochondrial permeability transition pore opening and cardiomyocyte rigor hypercontracture in the first few minutes of reperfusion. Reperfusion of ischemic animal hearts with an acidic buffer can reduce infarct size (239). Therefore, a potential treatment strategy for preventing lethal myocardial reperfusion injury would be to slow the normalization of physiologic pH at the time of myocardial reperfusion or by slowing the process of myocardial reperfusion, as in the case of ischemic preconditioning (122).

D) The mitochondrial permeability transition pore (MPTP) as a target for cardioprotection. The MPTP is a nonselective channel of the inner mitochondrial membrane, the opening of which results in mitochondrial membrane depolarization and uncoupling of oxidative phosphorylation, leading to ATP depletion and cell death. As such, preventing MPTP opening at the time of reperfusion by administering MPTP inhibitors (e. g., cyclosporin A) at the onset of myocardial reperfusion has been reported in experimental studies to reduce infarct size by 40–50% in animal myocardial infarction models (240). Thus, MPTP may be an important therapeutic target for preventing lethal myocardial reperfusion injury (122).

E) Against inflammatory response. It is unclear whether the inflammatory response that accompanies an AMI contributes to the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury or whether it is a reaction to the acute myocardial injury. Although experimental studies have

reported significant reduction of infarct size by inhibiting the inflammatory process at the time of myocardial reperfusion and the inhibition of complement activation, corresponding clinical studies using this therapeutic approach have been largely negative (122).

F) Against late myocardial reperfusion injury. Some of the described stimulators of myocardial reperfusion injury all appear to operate in the first few minutes of myocardial reperfusion, providing a narrow window for reducing infarct size in patients. However, several other important processes such as apoptosis and inflammation, which are also initiated during ischemia and continue over several hours into reperfusion, may contribute to the development of lethal myocardial reperfusion injury. These contributing pathways provide a potential second therapeutic window for reducing infarct size. However, this is a controversial area of research, and some experimental studies have failed to demonstrate an increase in infarct size with reperfusion time. Several experimental studies have reported that administering cardioprotective agents such as erythropoietin (anti-apoptotic), $\text{PI3K-}\gamma/\delta$ inhibitors (anti-inflammatory), and intracoronary aqueous oxygen, from 30 minutes to 24 hours into myocardial reperfusion may still limit acute myocardial infarct size at 72 hours. This may provide an additional therapeutic window to target late into the reperfusion phase (122).

G) Antagonists for endothelin ETA and ETB receptors. As ET-1 may have a relevant role in pathophysiology of myocardial ischemia-reperfusion, this has stimulated the possible beneficial effects of endothelin-receptor-blockade to protect the heart against reperfusion injury. However, this research has yielded unclear results. Respect to this issue, it could be of interest to take in mind the probable interaction between NO and ET-1.

Efficacy of the non-selective endothelin antagonist I-753037 was examined in a model of canine coronary artery occlusion and reperfusion to assess whether blockade of both ETA and ETB receptors would enhance or reduce myocardial ischemic injury. The results suggest that this non-selective endothelin antagonist provides significant myocardial protection primarily by improving regional myocardial flow distribution following reperfusion, and demonstrated no detrimental effects associated with blockade of the ETB receptor (241).

Endothelin ETA and ETB receptor antagonists could be cardioprotective during myocardial ischemia and reperfusion through a NO-dependent mechanism. To investigate whether the ETA and ETB receptor antagonist, bosentan, is cardioprotective in atherosclerotic mice, buffer-perfused hearts from apolipoprotein E/LDL receptor double knockout and wild-type mice were subjected to global ischemia and reperfusion. Following reperfusion, the recovery of left ventricular function was equally impaired in wild-type and double knockout mice given vehicle. The ETA/ETB receptor antagonist bosentan improved recoveries in wild-type and in double knockout

mice. Similar effects were observed for the recovery of left ventricular end-diastolic pressure, developed pressure and dp/dt . Bosentan improved the recovery of coronary flow in both double knockout and wild-type mice. Recovery of coronary flow was significantly higher in the double knockout mice given bosentan than in the wild-type group. ET-1 impaired recovery of coronary flow in both wild-type and double knockout mice though this effect was more pronounced in the double knockout mice. Coronary outflow of NO during reperfusion was enhanced in both double knockout and wild-type mice following bosentan administration. Therefore, the ETA/ETB receptor antagonist bosentan may protect the atherosclerotic mouse heart from ischemia-reperfusion injury. The observation that endothelin receptor blockade and stimulation have a greater effect on coronary flow in atherosclerotic hearts indicates an increased activation of the endothelin system in atherosclerotic coronary arteries (242).

In our laboratory we have compared the effects of antagonists for endothelin ETA and ETB receptors on the action of ischemia-reperfusion on endothelial and myocardial function. The study we carried out in anesthetized goats, in which 30 min of partial or total occlusion followed by 60 min of reperfusion of the left circumflex coronary artery was induced in animals treated with intracoronary administration of saline (vehicle), BQ-123 (endothelin ETA receptors antagonist) or BQ-788 (endothelin ETB receptors antagonist). During reperfusion after partial occlusion, coronary vascular conductance and left ventricle contractility were decreased after saline or BQ-788, and they normalized after BQ-123. In these three groups of animals, the coronary effects of Ach and sodium nitroprusside during reperfusion were as under control. During reperfusion after total occlusion, coronary vascular conductance and left ventricle function were decreased after saline, and they normalized after BQ-123 or BQ-788 treatment. In these three groups of animals, the coronary effects of Ach but not those of sodium nitroprusside during reperfusion were decreased after saline, and they reversed after BQ-123 or BQ-788 treatment. Therefore, selective antagonists of endothelin ETB and ETA receptors may produce similar protection of coronary vasculature and myocardium against reperfusion after severe ischemia. Selective antagonists of endothelin ETB receptors, contrarily to those of endothelin ETA receptors may be ineffective to protect coronary vasculature and myocardium against reperfusion after mild ischemia. Probably it may be more beneficial the use of antagonists for both subtypes of endothelin receptors (243). In addition of antagonists for ETA receptors, the use of antagonists for ETB receptors is supported by studies performed in pig coronary arteries (202) in which it seems to be that ischemia-reperfusion increases the coronary vasoconstriction in response to ET-1 probably due to impairment of endothelin ETB receptor-induced release of NO and prostacyclin, to augmentation of the contractile response to activation of endothelin ETB receptors, and to increased release of vasoconstrictor prostanoids.

Left ventricular hemodynamic variables were measured in the Langendorff-perfused model after 40- and 20-minute regional or global ischemia, followed by 30-minute reperfusion. Wild-type and ETB-deficient rats were compared. Left ventricular dysfunction was more prominent in ETB-deficient rats, particularly after regional ischemia. Infarct size was smaller in wild-type than ETB-deficient rats after 40 minutes of regional ischemia-reperfusion. Although the recovery of left ventricular function was poorer after 40-minute ischemia-reperfusion, end-diastolic pressure in ETB-deficient rats was higher after 20 than after 40 minutes of regional ischemia-reperfusion. It is concluded that ETB receptors exert cytoprotective effects in the rat heart, mainly after regional ischemia-reperfusion. Longer periods of ischemia suppress the recovery of left ventricular function after reperfusion, but the role of ETB receptors may be more important during the early phases (244).

In rabbits subjected to 1 h of coronary artery occlusion followed by 3 h of reperfusion, left ventricle unloading was initiated 15 min prior to reperfusion and was maintained during reperfusion. Animals were treated with the ETA receptor antagonist BQ123. In parallel, isolated rabbit cardiomyocytes subjected to simulated ischemia-reperfusion with or without ET-1 or BQ123, intracellular calcium and cell death were assessed with flow cytometry. From the results of this study, the authors suggest that components of reperfusion injury involve ET-1 release which stimulates calcium overload and apoptosis. Intravenous ETA receptor blockade prior to reperfusion may be a protective adjunct to reperfusion therapy in acute myocardial infarction patients. Thus, endogenous ET-1 released during acute myocardial infarction might mediate ischemia-reperfusion injury by stimulating increased intracellular calcium concentration, and apoptosis (245).

In patients with type 2 diabetes and coronary artery disease it has been observed that both selective ETA and dual ETA/ETB receptor antagonists improve endothelium-dependent vasodilatation. ETB receptor blockade increases basal blood flow but does not additionally improve endothelium-dependent vasodilatation (246). Safety and feasibility of selective ETA receptor blockade in ST-elevation acute coronary syndrome (STE-ACS) within a larger randomized trial was assessed in patients. Patients with posterior-wall STE-ACS were randomly assigned to receive intravenous BQ-123 or placebo over 60 min, starting immediately prior to primary percutaneous coronary intervention. Twenty-four hour Holter recordings were performed during hospitalization for STE-ACS and after 6–8 weeks. The predefined primary endpoint was the documentation of ventricular tachycardia and/or late potentials at follow-up. Based on the analysis of long-term ECG data, short-term administration of BQ-123 after AMI was safe (247).

The studies shown before support the idea that ET-1 could play a relevant role in the adverse effects of ischemia-reperfusion on the myocardium, including coronary vasculature. These adverse effects of ET-1 may

be mediated by both endothelin ETA and ETB receptors; endothelin ETB receptors situated in the endothelium may reduce their function probably due to endothelium damage, whereas those situated in smooth muscle cells of coronary arteries acquire a high role and thus contributing, together with endothelin ETA receptors, to the adverse coronary effects of ET-1. Thus, the treatment with blockers of both endothelin ETA and ETB receptors may protect the myocardium and coronary vasculature against the adverse effects of ischemia-reperfusion, and in consequence it may reduce reperfusion injury.

H) Urocortin. This substance is a 40 amino-acid peptide which has a high degree of structural homology with the peptide corticotrophin-releasing factor (CRF), and has marked cardiovascular effects. In the heart, exogenous urocortin produces coronary vasodilation (248). Also, it has been demonstrated that urocortin production may be increased in cardiac cells exposed to ischemia and that exogenous urocortin may protect myocardium during coronary ischemia (249), and that urocortin reduces the infarct area in the ischemic and reperfused rat heart (250). Several mechanisms may be involved in this protective effect of urocortin in the myocardial cells (251). To explore the action of urocortin on the adverse effects of ischemia-reperfusion on coronary vasculature, hearts from rats were perfused at constant flow and then exposed to 15 mins ischemia followed by 15 mins reperfusion. In one series of experiments, we found that the coronary relaxation to urocortin was reduced after ischemia-reperfusion. Treatment with a low threshold concentration of urocortin, administered before ischemia and during reperfusion, improved the coronary relaxation to Ach after ischemia-reperfusion. Therefore, this condition impairs the coronary vasodilation to urocortin and produces endothelial dysfunction, and this endothelial dysfunction may be improved by urocortin (252).

In other series of experiments (253), we observed that the urocortin-induced improvement of the coronary relaxation to Ach after ischemia-reperfusion was not modified by treatment with tetraethylammonium, blocker of Ca^{2+} dependent-potassium channels; glibenclamide, blocker of K (ATP) channels; L-NAME, blocker of NO synthesis; or meclofenamate, blocker of cyclooxygenase, but it was abolished by chelerythrine, blocker of protein kinase C. Thus, it is suggested that urocortin may protect coronary endothelial function during ischemia-reperfusion by activation of protein kinase C. Therefore, urocortin may act as an endogenous protective factor of the heart during ischemia. These protective effects of urocortin may act on the endothelial function (252) as well as on the myocardial function (249, 250) during ischemia-reperfusion. Urocortin may activate ATP-sensitive and Ca^{2+} -sensitive potassium channels in cardiac myocytes and in vascular smooth muscle cells, respectively. However, we found that neither glibenclamide nor TEA modified the urocortin-induced improvement of the coronary endothelial function, suggesting that these channels do not seem to be involved in the protective effect of urocortin on endothelial cells

during ischemia-reperfusion. Brar et al also suggest that the protective effect of urocortin on the endothelial cells during ischemia-reperfusion may be mediated by activation of protein kinase C, as an inhibitor of this enzyme, chelerythrine, abolished the improvement of endothelial function by urocortin (249). Gordon et al. (254) also found that the protection by urocortin against ischemia-reperfusion in adult rat cardiomyocytes was attenuated by chelerythrine. Also, our results partly agree with those of Lawrence et al. (255), who showed involvement of protein kinase C epsilon in the prevention of mitochondrial damage during ischemia-reperfusion. However, in the studies of Gordon et al. (254) and Lawrence et al. (255), KATP channels were also involved, a phenomenon that was not observed in our study. It may be supposed that urocortin action may share some mechanisms, but not others, in endothelial and myocardial cells. In conclusion, our results suggest that relatively low concentrations of urocortin may protect endothelial function in the coronary circulation against deleterious effects of ischemia-reperfusion through activation of protein kinase C. Urocortin might act as an endogenous protective factor in the heart during coronary ischemia-reperfusion, and identification of its protective mechanisms on endothelial function may help to prevent the coronary vascular dysregulation that occurs after heart ischemia (252, 253). With respect to this, it is remarkable that a recent study in humans (256) provided the first evidence that human urocortin prevents the development of atherosclerosis by suppressing endothelial cell inflammatory response and proliferation, macrophage foam cell formation, and vascular smooth muscle cell migration and proliferation. Thus, human urocortin might serve as a novel therapeutic agent for atherosclerotic cardiovascular diseases (256).

5. CONCLUSIONS

Acute coronary syndromes (e. g., acute myocardial infarction (AMI)) are the most lethal of cardiovascular diseases, but the mortality rates of these syndromes are going down in developed countries as a result of better prevention and treatment. The most effective treatment of AMI is timely (early) reperfusion of the myocardial ischemic zone. However, not all it is favorable with myocardial reperfusion as this procedure may also damage myocardium, which is known as "reperfusion injury".

The present Review pays particular attention to the coronary circulation and to the role of NO and ET-1 in the regulation of this circulation under normal conditions and after ischemia-reperfusion. Also, it is considered therapeutical strategies for ischemia-reperfusion injury, with special mention to antagonists for endothelin receptors. The coronary circulation plays a crucial role in pathophysiology of ischemia-reperfusion and reperfusion injury, after all it is the cause and victim of this condition. Ischemia-reperfusion damages not only cardiomyocytes, but also coronary vasculature. The damage to this vasculature may vary from functional impairment of

endothelium to severe structural alterations of the vasculature, and finally to vascular thrombosis and the no-reflow phenomenon, which may underly reperfusion injury. The endothelium plays a relevant role in the regulation of the coronary circulation, and it could exist a functional interaction between NO and ET-1 in the coronary artery wall, with predominance of NO over ET-1 and also with a relevant role of NO in modulation of coronary effects of ET-1 under normal conditions. The endothelium seems to be highly sensitive to ischemia, and after ischemia-reperfusion the endothelial function and the interaction between NO and ET-1 are altered, and now ET-1 predominates over NO and the modulator role of NO in the effects of ET-1 is decreased. These features lead to decreased endothelium-dependent coronary vasodilatation, particularly that mediated by NO, and also to increased coronary vasoconstrictor response to ET-1. After ischemia-reperfusion, the production of ET-1 seems to be augmented, and the equilibrium between endothelin receptors may be altered with an increased role of the smooth muscle cells ETA and ETB receptors in the augmented coronary vasoconstriction to ET-1. It is probable that ischemia-reperfusion by damaging the endothelium it decreases the NO-mediated vasodilation of coronary vessels, and at the same time it augments the production of ET-1 and its coronary vasoconstrictor effects. This damage of the endothelium and the augmented presence of ET-1 and of its coronary effects, would contribute to produce vascular dysfunction, vascular damage, vascular thrombosis and the non-reflow phenomenon, thus contributing to reperfusion injury. From these considerations, it can be suggested that ET-1 plays a significant role in pathophysiology of coronary ischemia-reperfusion and of reperfusion injury, and therefore it is reasonable to expect that the use of antagonists for endothelin ETA and ETB receptors could be beneficial for protecting the heart against this condition.

6. REFERENCES

1. Canty, JM, Jr. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In: P. Libby, R. O. Bonow, D. L. Mann, D. P. Zipes, Eds. Braunwald's Heart Disease, a text for cardiovascular medicine. Saunders-Elsevier 2008, 8th Edition, Chapter 48, pp. 1167-1194.
2. Antman EM, E. Braunwald E. ST-elevation myocardial infarction: pathology, pathophysiology, and clinical features, In: P. Libby, R. O. Bonow, D. L. Mann, D. P. Zipes, Eds. Braunwald's Heart Disease, a text for cardiovascular medicine. Saunders-Elsevier 2008, 8th Edition, Chapter 50, pp. 1207-1232.
3. Canto JG, Kiefe CI, Rogers WJ, Peterson ED, Frederick PD, French WJ, Gibson CM, Pollack CV Jr, Ornato JP, Zalenski RJ, Penney J, Tiefenbrunn AJ, Greenland P, NRI Investigators. Atherosclerotic risk factors and their association with hospital mortality among patients with first myocardial infarction (from the National Registry of Myocardial Infarction). *Am J Cardiol* 2012; 110:1256-61.
4. Bucholz EM, Butala NM, Rathore SS, Dreyer RP, Lansky AJ, Krumholz HM, Sex Differences in Long-Term Mortality After Myocardial Infarction. A Systematic Review, *Circulation* 2014; 130: 757-67;
5. Matsuzawa Y, Guddetia RR, Kwona T-G, Lermanb LO, Lermana A. Treating Coronary Disease and the Impact of Endothelial Dysfunction. *Progr in Cardiovasc Dis* 2015; 57 (5), 431-42.
6. Chazov EI, Matveeva LS, Mazaev AV, Sargin KE, Sadovskaia GV, Ruda MI. Intracoronary administration of fibrinolytic in acute myocardial infarction. *Ter Arkh* 1976; 48 (4):8-19.
7. Gruntzig AR, King SB, Schlumpf M, Siegentheler W. Long-term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1987; 316: 1127-32.
8. Van der Wert F. The history of coronary reperfusion. *Eur Heart J* 2014; 268: 2510-15.
9. Braunwald E. The treatment of acute myocardial infarction: the past, the present, and the future. *Eur Heart J: Acute Cardiovascular Care* 2012; 1 (I): 9-12.
10. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword?, *J. Clin. Invest* 1985; 76: 1713-19.
11. Jennings RB, Wartman WB. Production of a homogeneous myocardial infarction in the dog. *Arch Path* 1957; 63:580-5.
12. Jennings RB, Sommers HM, Smith GA, Flack HM, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Patol* 1960 70: 68-78.
13. Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury, *Circ Res* 2013; 113: 428-38.
14. Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A, Levkau B, Schulz R, Erbel R. The coronary circulation in cardioprotection: more than just one confounder. *Cardiovascular Research* 2012; 94: 237-45
15. Duncker DJ, Koller A, Merkus D, Canty JM, Jr. Regulation of Coronary Blood Flow in Health and Ischemic Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2015; 57 (5): 409-22.
16. Kern MJ, Lerman A, Bech J-W, De Bruyne B, Eeckhout E, Fearon WF, Higano ST, Lim MJ, Meuwissen M, Piek JJ, Pijls NHJ, Siebes M, Spaan JAE. Physiological Assessment of Coronary Artery Disease in the Cardiac Catheterization Laboratory. A Scientific Statement From the American Heart Association Committee on Diagnostic and Interventional Cardiac Catheterization, Council on Clinical Cardiology. *Circulation* 2006; 114:1321-41.
17. Beyer AM, Gutterman DD. Regulation of coronary microcirculation. *J. Moll Cell Cardiol* 2012; 52 (4): 814-21.
18. Drenjancevic I, Kolle A, Selthofer-Relatic K, Grizelj I, Cavka A. Assessment of Coronary Hemodynamics

- and Vascular Function. *Prog. Cardiovasc. Dis*2015;57 (5):423-30.
19. Triggie CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol*2012;90 (6):713-38.
20. Deanfield JE. Endothelial Function and Dysfunction. Testing and Clinical Relevance. *Circulation*2007;115: 1285-95.
21. Vanhoutte PM. History of Discovery, How We Learned to Say NO, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2009; 29: 1156-60.
22. Furchgott RF, Zawadzki JV., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 1980;27::373-76.
23. Hickey KA, Rubany G, Paul RJ, Highsmutg RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by endothelial cells. *Am J. Physiol (Cell Physiol)* 1985;248 (5): C550-C556.
24. Furchgott RF. Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide. *Biosci Rep* 1999;19 (4):235-51.
25. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* 2004; 93 (1): 105–13.
26. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res*2005;66 (2): 286–94.
27. Vanhoutte PM. Regeneration of the endothelium in vascular injury. *Cardiovasc. Drugs Ther*2010;24 (4): 299–303.
28. Voghel G, Carrier M, Fortier A, Thorin E, Perrault LP, Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech. Ageing Dev*2007;128 (11–12): 662–71.
29. Thorin E, Thorin-Trescases N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc. Res*2009;84 (1): 24–32.
30. Verma S, Buchannan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*2003;108:2054-59.
31. Anderson TJ, Phillips SA. Assessment and Prognosis of Peripheral Artery Measures of Vascular Function. *Prog Cardiovasc Dis* 2015;57 (5), 497–509
32. Dancu M B, Tarbell JM. Coronary endothelium expresses a pathologic gene pattern compared to aortic endothelium: correlation of asynchronous hemodynamics and pathology in vivo. *Atherosclerosis*2007;192 (1):9-14.
33. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*1986; 315 (17):1046-51.
34. Flammer AJ, Luscher TF. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflugers Arch* 2010;459:1005–13.
35. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: blunted response in essential hypertension. *Circulation*1990; 81:1762–67.
36. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*2007; 87 (1):315–424.
37. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725–28.
38. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999;19:51–71.
39. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–42.
40. Furchgott RF, Martin W, Jothianandan D, Villani GM. Comparison of endothelium-dependent relaxation by acetylcholine and endothelium-independent relaxation by light in the rabbit aorta. In: Paton WD, Mitchell J, Turner P, editors. *Proceedings of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology*. London: Macmillan Press; 1984. pp. 149–57.
41. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM, editor. *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium*. New York: Raven Press; 1988. pp. 401–14.
42. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237:893–900.
43. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin Hematol* 1989;26:63–76.
44. Moncada S, Herman AG, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8:365–68.
45. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347:768–70.
46. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:9030–33.
47. Grasmann H, Drazen JM, Deykin A, Israel E, De Sanctis GT, Pillari A, Yandava CN. Simple tandem repeat polymorphisms in the neuronal nitric oxide synthase gene in different ethnic populations. *Hum*

- Hered 1999; 49:139–41.
48. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992;176:599–604.
49. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256:225–28.
50. Shaha AM, MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 86 (1), 49–86.
51. Massion PB, O. Dessy FC, Balligand J. -L. Nitric Oxide and Cardiac Function-Ten Years After, and Continuing, *CirculRes* 2003; 93:388-98
52. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 3: 521–31.
53. McDonald KK, Rouhanib R, Handlogtena ME, Blockd ER, Griffithc OW, Allisona RD, Kilberga MS. Inhibition of endothelial cell amino acid transport System y+ by arginine analogs that inhibit nitric oxide synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1997; 1324 (1): 133–14;
54. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:168–75.
55. Flammer AJ, Luscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly*2010;140:w13122.
56. RubanyiGM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flowinduced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-H1149.
57. HodgsonJMCB. Marshall JJ. Direct vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation. Mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in patients with nonstenotic coronary arteries. *Circulation*1989;79: 1043-51.
58. ChesterAH, O'neil GS, Tadjkarimi S, PalmerRMJ. MoncadaS, Yacoub MH. The role of nitric oxide in mediating endothelium dependent relaxations in the human epicardial coronary artery. *Int. J. Cardiol* 1990; 29: 305-9.
59. Chu A, Chambers DE, Lin C-C, Kuehl WD, Palmer RMJ, Moncada S, Cobb FR. Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endotheliumdependent responses of the coronary arteries in awake dogs. *J. Clin. Invest* 1991; 87: 1964-68.
60. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *JPET* 1981; 219 (1): 181-6.
61. García JL, Fernández N, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the goat coronary circulation under basal conditions and after vasodilator stimulation. *Br J Pharmacol* 1992; 106 (3):563-7.
62. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1985;25: 171-91.
63. GardinerSM, KempPA, BennettT. Effects of N0-nitro-L-arginine methyl ester on vasodilator responses to acetylcholine. 5-N-ethylcarboxamidoadenosine or salbutamol in conscious rats. *Br. J. Pharmacol*1991;103: 1725-32.
64. Moncada S, ReesDD, SchulzR, Palmer RMJ. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc. Nati. Acad. Sci. U. S. A* 1991;88: 2166-70
65. Ueeda M, Arroyo IH. OlssonRA. Role of nitric oxide (N=O) in coronary reactive hyperemia (RH) and the active hyperemic response to pacing (AG). (Abstract). *The Physiologist*1990;33: A-78.
66. Fernández N, Sánchez MA, Martínez MA, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Role of nitric oxide in vascular tone and in reactivity to isoproterenol and adenosine in the goat coronary circulation. *Eur J Pharmacol* 2000; 387 (1):93-9.
67. Thorin E, Clozel M. The Cardiovascular Physiology and Pharmacology of Endothelin-1. *Adv Pharmacol* 2010; 60: 1–26.
68. Mazzuca MQ, Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease *Biochem Pharmacol* 2012; 15;84 (2):147-62.
69. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annu Rev Physiol* 1986;48:307–20.
70. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6964–67.
71. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411–15.
72. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348:730–32.
73. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:732–35.
74. Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli W, Gray GA, Hirth G, Löffler BM, Muller M, Neidhart

- W, H RamuzH. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993;365:759-61.
75. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006;111:508-31.
76. Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 1999;126:391-98.
77. Callera G, Tostes R, Savoia C, Muscara MN, Touyz RM. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho) physiology. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007;5:531-52.
78. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-76.
79. Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyantoro B, Adiarto S, Iwasa N, Nonaka H, Rikitake Y, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Hirata K. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovasc Res* 2009; 82:143-51.
80. Nguyen A, Thorin-Trescases N, Thorin E. Working under pressure: coronary arteries and the endothelin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298 (5):R1188-94.
81. Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Quyyumi AA. Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET (A) receptor blockade. *Circ Res* 2001; 89:969-76.
82. Callera G, Tostes R, Savoia C, Muscara MN, Touyz RM. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho) physiology. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5:531-52.
83. Thorin E, Parent R, Ming Z, Lavallee M. Contribution of endogenous endothelin to large epicardial coronary artery tone in dogs and humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;277:H524-H532.
84. Ezra, D, Goldstein RE, Czaja JF, Feuerstein GZ. Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am. J. Physiol.* 257 (Heart Circ. Physiol) 1989; 257 (1): H339-H343.
85. Kurihara H, Yamaoki K, Nagai R, Yoshizumi M, Takaku F, Satoh H, Inui J, Yazaki Y. Endothelin: a potent vasoconstrictor associated with coronary vasospasm. *Life Sci* 1989; 44: 1937-43.
86. Chester AH, Dashwood MR, Clarke JG, Larkin SW, Davies GJ, Tadjkarimi S, Maseri A, Yacoub MH. Influence of endothelin on human coronary arteries and localization of its binding sites. *Am. J. Cardiol* 1989; 63: 1395-98.
87. Franco-Cereceda A. Endothelin- and neuropeptide Y-induced vasoconstriction of human epicardial coronary arteries in vitro. *Br. J. Pharmacol* 1989; 97:968-72.
88. Diéguez G, García JL, Fernández N, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B. Cerebrovascular and coronary effects of endothelin-1 in the goat. *Am J Physiol* 1992; 263 (4):R834-9.
89. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48 (2-3):109-14, .
90. Climent B, Fernández N, Sanz E, Sánchez A, Monge L, García-Villalón A-L, Diéguez G. Enhanced response of pig coronary arteries to endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of endothelin receptors, nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 2005; 524, 102-10.
91. Bax WA, Bruinvels AT, van Suylen R-J, Saxena PR, Hoyer D. Endothelin receptors in the human coronary artery, ventricle and atrium. A quantitative autoradiographic analysis, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1993; 348:403-10.
92. Ushio-Fukai M, Nishimura J, Kobayashi S, Kanaide H. Endothelin-1 and endothelin-3 regulate differently vasoconstrictor responses of smooth muscle of the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 1995; 114 (1):171-79.
93. Wang Q-D, Li X-S, Pernow J. Characterization of endothelin-1-induced vascular effects in the rat heart by using endothelin receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol* 1995; 271 (1):25-30.
94. Balwierczak JL. Two subtypes of the endothelin receptor (ETA and ETB) mediate vasoconstriction in the perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 (Suppl. 8): S248.
95. Riegel DF, Næpe RW. Differential responsiveness of conduit and resistance coronary arteries to endothelin A and B receptor stimulation in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1993; 22 (Suppl. 8): S243.
96. García JL, Fernández N, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Coronary vasoconstriction by endothelin-1 in anesthetized goats: role of endothelin receptors, nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 1996; 315 (2):179-86.
97. García-Villalón AL, Fernández N, Monge L, Salcedo A, Diéguez G. Effects of endothelin-1 on the relaxation of rat coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54 (5):445-50.
98. Fernández N, García JL, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Coronary vasoconstriction produced by vasopressin in anesthetized goats. Role of vasopressin V1 and V2 receptors and nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1998; 26;342 (2-3):225-33.
99. García-Villalón AL, García JL, Fernández N, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Regional differences in the arterial response to vasopressin: role of endothelial nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1996; 118 (7):1848-54.
100. Martínez MA, Fernández N, García-Villalón AL, Monge L, Diéguez G. Comparison of the in vivo

- coronary action of endothelin-1 and vasopressin role of nitric oxide and prostanoids. *Vascul Pharmacol* 2003;40 (5):247-52.
101. Brunner F, Stessel H, Kukovetz WR. Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. *FEBS Lett* 1995; 376:262-66.
 102. Brunner F. Tissue endothelin-1 levels in perfused rat heart following stimulation with agonists and in ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1953-63.
 103. Dagassan PH, Breu V, Clozel M, Kunzli A, Vogt P, Turina M, Kiowski W, Clozel JP. Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27:147-53.
 104. Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, Siebenmann R, Turina M, Buhler FR. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 1990;66:1088-94.
 105. Antoniadis C, Shirodaria C, Crabtree M, Rinze R, Alp N, Cunningham C, Diesch J, Tousoulis D, Stefanadis C, Leeson P, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Altered plasma versus vascular bipterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2007; 116:2851-59.
 106. Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Bofilis E, Tousoulis D, Antoniadis A, Webb DJ. Endogenous endothelin maintains coronary artery tone by endothelin type A receptor stimulation in patients undergoing coronary arteriography. *Heart* 2000;84:176-82
 107. Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Quyyumi AA. Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET (A) receptor blockade. *Circ Res* 2001;89:969-76.
 108. Bohm F, Jensen J, Svane B, Settergren M, Pernow J. Intracoronary endothelin receptor blockade improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:745-51
 109. Granado M, Rubio C, Amor S, Monge L, Fernández N, Carreño-Tarragona G, Carrascosa JM, García-Villalón ÁL. Effects of age and caloric restriction on the cardiac and coronary response to endothelin-1 in rats. *Exp Gerontol* 2014; 60:183-89.
 110. Fernández N, Martínez MA, García-Villalón AL, Monge L, Diéguez G. Coronary effects of endothelin-1 and vasopressin during acute hypotension in anesthetized goats. *Life Sci* 2005; 77 (4): 423-34.
 111. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013;123 (1):92-100
 112. Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J. Protection Against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Clinical Practice, *Rev Esp Cardiol* 2014;67:394-404.
 113. Bopassa JC, Protection of the ischemic myocardium during the reperfusion: between hope and reality, *Am J Cardiovasc Dis* 2012; 2 (3): 223-36.
 114. Kloner RA. New observations regarding post-ischemia-reperfusion myocardial swelling. *J Amer Col Cardiol* 2015 65 (4): 324-26.
 115. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990;82:II2-II12.
 116. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983;68:125-136.
 117. Shrader D. On dying more than one death. *Hastings Cent Rep* 1986;16:12-7.
 118. Jones CE, Thomas JX, Parker JC, Parker RE. Acute changes in high energy phosphates, nucleotide derivatives, and contractile force in ischaemic and nonischaemic canine myocardium following coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1976;10:275-82.
 119. Ross J Jr, Franklin D. Analysis of regional myocardial function, dimensions, and wall thickness in the characterization of myocardial ischemia and infarction. *Circulation* 1976;53:188-92.
 120. Harden WR III, Barlow CH, Simson MB, Harken AH. Temporal relation between onset of cell anoxia and ischemic contractile failure. Myocardial ischemia and left ventricular failure in the isolated, perfused rabbit heart. *Am J Cardiol* 1979; 44:741-46.
 121. Garlick PB, Radda GK, Seeley PJ. Studies of acidosis in the ischaemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Biochem J* 1979;184:547-54.
 122. Opie LH. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia. *Circ Res* 1976;38:152-174..
 123. Kleber AG. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res* 1983;52:442-50.
 124. Krug A, Du Mesnil de Rochement R, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res* 1966; 19 (1):57-62.
 125. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wave front phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs. duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56 (5): 786-94.
 126. Reimer KA, Jennings RB. The wavefront phenomenon of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 40: 633-44.
 127. Hearse DJ, Tosaki A. Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ Res* 1987;60 (3):375-83.

128. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998;97 (18):1848–67.
129. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3 (9):499–506.
130. Luo AK, Wu KC. Imaging microvascular obstruction and its clinical significance following acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2006;11 (4):305–12.
131. Jennings RB, Murry CE, Stenberger C, Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990; 82 (suppl II): II2-II12.
132. Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li R-K, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 2332-36
133. Ku DD. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science* 1982; 218: 576-8
134. Kim, YD, Fomsgaar, JS, Heim KF, Ramwell PW, Thomas G, Kagan E, Moore SP, Coughlin SS, Kuwahara M, Analoui A, Myers AK. Brief ischemia-reperfusion induces stunning of endothelium in canine coronary artery. *Circulation* 1992; 85, 1473–82.
135. Bolli R, Triana JF, Jeroudi MO. Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia. *Circ Res* 1990; 67:332-343. Abstract.
136. Dauber IM, VanBenthuyzen KM, McMurtry IF, Wheeler GS, Lesnefsky EJ, Horwitz LD, Weil JV. Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; 66:986-998. Abstract.
137. Sellke FW, Quillen JE, Harrison DG. Effects of vasopressin on the coronary circulation following ischemia and reperfusion. *Faseb J* 1991;5 (part II):A1387.
138. Gross GJ, O'Rourke ST, Pelc LR, Warltier DC. Myocardial and endothelial dysfunction after multiple, brief coronary occlusions: role of oxygen radicals. *Am J Physiol* 1992;263:H1703-9.
139. Ehrling T, Krajcar M, Baumgart D, Kompa S, Hümmelgen M, Heusch G. Cholinergic and α -adrenergic coronary vasomotion with increasing ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1995; 268:H886-94.
140. Nichols WW, Nicolini FA, Yang B, Robbins WC, Katopodis J, Chen L, Saldeen TGP, Mehta JL. Attenuation of coronary flow reserve and myocardial function after temporary subtotal coronary artery occlusion and increased myocardial oxygen demand in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:795–803.
141. Gewirtz H, Saksen H, Steiner M, Most AS. Impaired arteriolar vasodilation induced by thrombosis of a coronary arterial stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1985;249:H1154-H1166. Abstract
142. Leineweber K, Böse D, Vogelsang M, Haude M, Erbel R, Heusch G. Intense vasoconstriction in response to aspirate from stented saphenous vein aortocoronary bypass grafts. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:981-986.
143. Böse D, Leineweber K, Konorza T, Zahn A, Brocker-Preuss M, Mann K, et al. Release of TNF- α during stent implantation into saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its relation to plaque extrusion and restenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2295-9. Abstract
144. Zhang C, Wu J, Xu X, Potter BJ, Gao X. Direct relationship between levels of TNF-alpha expression and endothelial dysfunction in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2010;105:453-464.
145. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357:1121-35.
146. Schulz R, Kelmb M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury *Cardiovasc Res* 2004; 61:402 –13.
147. Ramachandran A, Jha S, Lefer DJ. Review Paper: Pathophysiology of Myocardial Reperfusion Injury: The Role of Genetically Engineered Mouse Models. *Veterin Pathol* vol. 2008; 45 (5): 698-706.
148. Fischer UM, Klass O, Cox CS, Stock U, Antonyan A, Brixius K, Fischer JH, Mehlhorn U, Bloch W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in myocardium subjected to cardioplegic arrest. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 57 (7):379-85.
149. Leucker TM, Bienengraeber M, Muravyeva M, Baotic U, Weihrauch D, Brzezinska AK, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF, Jr. Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51 (5):803-11.
150. Bolli R. Cardioprotective Function of Inducible Nitric Oxide Synthase and Role of Nitric Oxide in Myocardial Ischemia and Preconditioning: an Overview of a Decade of Research *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1897–918.
151. Depre C., Fierain L., Hue L. Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovasc Res* 1997; 33:82–7.
152. Li J, Zhang H, Zhang C. Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52 (4):865-72.
153. Giraldez RR, Panda, Xia Y, Sanders P, Zweier JL. Decreased nitric oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1997; 272:21420–26. Abstract.
154. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1996; 271:29223–30. Abstract.
155. Amrani M., Chester A. H., Jayakumar J., Schyns C. J., Yacoub M. H. L-Arginine reverses low coronary reflow and enhances postischemic recovery of

- cardiac mechanical function. *Cardiovasc Res* 1995; 31995; 0:200–4.
156. Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280 (3):H1105-12
 157. Brunner F. Interaction of nitric oxide and endothelin-1 in ischemia/reperfusion injury of rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29 (9):2363-74.
 158. Zhao YB, Wang YZ, Yue YH, Zhao WC, Feng GX. Variation of plasma levels of endothelin, calcitonin gene-related peptide, nitric oxide, and malondialdehyde in acute myocardial ischemia reperfusion injury in a rabbit model. *Genet Mol Res* 2015; 14 (2):5577-84.
 159. Pabla R, Buda AJ, Flynn DM, Blessé SA, Shin AM, Curtis MJ, Lefer DJ. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ. Res* 1996; 78: 65-72.
 160. Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, Haybron DM, Young HH, Ignarro. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.* 1992; 262: 16-20.
 161. Kawahara K, Hachiro T, Yokokawa T, Nakajima T, Yamauchi Y, Nakayama Y. Ischemia/reperfusion-induced death of cardiac myocytes: possible involvement of nitric oxide in the coordination of ATP supply and demand during ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40 (1):35-46.
 162. Jones SP, Hoffmeyer MR, Sharp BR, Ho YS, Lefer DJ Jones SP, Hoffmeyer MR, Sharp BR, Ho YS, Lefer DJ. Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H277–82
 163. Khan IA. Role of endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Chest* 2005; 127: 1474-6.
 164. Niccoli G, Lanza GA, Shaw S, Romagnoli E, Gioia D, Burzotta F, Trani C, Mazzari MA, Mongiardo R, De Vita M, Rebuzzi AG, Lüscher TF, Crea F. Endothelin-1 and acute myocardial infarction: a no-reflow mediator after successful percutaneous myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2006; 27: 1793-8.
 165. Adlbrecht C, Bonderman D, Plass C, Jakowitsch J, Beran G, Sperker W, Siostrzonek P, Glogar D, Maurer G, Lang IM. Active endothelin is an important vasoconstrictor in acute coronary thrombi. *Thromb Haemost.* 2007; 97 (4):642-9.
 166. Kolettis T, Barton M, Langleben D. Endothelin in coronary artery disease and Myocardial Infarction. *Cardiology in Review* 2013; 21 (5):249–56.
 167. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89: 1573-1579. 166-205.
 168. Yip HK, Wu CJ, Chang HW, Yang CH, Yu TH, Chen YH, Hang CL. Prognostic value of circulating levels of endothelin-1 in patients after acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty. *Chest* 2005; 127:1491–7.
 169. Niccoli G, Lanza GA, Shaw S, Romagnoli E, Gioia D, Burzotta F, Trani C, Mazzari MA, Mongiardo R, De Vita M, Rebuzzi AG, Lüscher TF, Crea F. Endothelin-1 and acute myocardial infarction: a no-reflow mediator after successful percutaneous myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2006; 27:1793–8.
 170. Eitel I, Nowak M, Stehl C, Adams V, Fuernau G, Hildebrand L, Desch S, MD, Schuler G, Thiele H. Endothelin-1 release in acute myocardial infarction as a predictor of long-term prognosis and no-reflow assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Am Heart J* 2010;159:882–90.
 171. Freixa X, Heras M, Ortiz JT, Argiró S, Guasch E, Doltra A, Jiménez M, Betriua A, Masottia M. Usefulness of Endothelin-1 Assessment in Acute Myocardial Infarction *Rev Esp Cardiol* 2011;64 (2):105-10.
 172. Yang Z, Li J, Kong J, Wu S. Impairment of vascular endothelial function following reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction *Int Med Res* 2013; 41 (4):1074-8.
 173. Kilickesmez KO, Bingöl G, Bulut L, Sinan UY, Abaci O, Ersanli M, Gurmen T. Relationship between serum endothelin-1 level and spontaneous reperfusion in patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Di* 2015;. 26 (1):37-41.
 174. Cao L, Huang C, Huang N, Li J. ET-1/NO: A controversial Target for Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Cardiology* 2014; 17 (2):140; Letter to Editor
 175. Wainwright CL, McCabe C, Kane KA. Endothelin and the ischaemic heart. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3 (4):333-4.
 176. Tsutamoto T, Wada A, Hayashi M, Tsutsui T, Maeda K, Ohnishi M, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Takayama T, Ishii C, Kinoshita M. Relationship between transcardiac gradient of endothelin-1 and left ventricular remodeling in patients with first anterior myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 346-55.
 177. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Maulik G, Cordis GA, Das DK. Nitric oxide signaling in ischemic heart. *Cardiovasc Res* 1995; 30:593–601.
 178. Lefer, A. M. Attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury with nitric oxide replacement therapy. *Ann Thorac Surg* 1995; 60, 847–51.
 179. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995; 30:432–39.
 180. Thompson M, Westwick J, Woodward B. Responses

- to endothelins-1, -2, and -3 and sarafotoxin 6c after ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart: role of vasodilator loss. *J. Cardiovasc. Pharmacol*1995;25:156–62.
181. Lockowandt U, Liska J, Franco-Cereceda A. Short ischemia causes endothelial dysfunction in porcine coronary vessels in an in vivo model. *Ann. Thorac. Surg*2001; 71: 265–9.
182. Watts JA, Chapat S, Johnson DE, Janis DE, Janis RA. Effects of nisodipine upon vasoconstrictor responses and binding of endothelin-1 in ischemic and reperfused rats hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19:929-36.
183. Fernández N, Martínez MA, Climent B, García-Villalón AL, Monge L, Sanz E, Diéguez G. Coronary reactivity to endothelin-1 during partial ischemia and reperfusion in anesthetized goats. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 2002;457 (2-3):161-8
184. Fernández Monsalve N, Martínez MA, Climent B, García-Villalón AL, Monge L, Elena Sanz E, Diéguez G. In vivo coronary effects of endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of nitric oxide and prostanoids. *Europ J Pharmacol* 2003; 481: 109-17.
185. Heyndrickx GR, Boettcher DH, Vatner V. Effects of angiotensin, vasopressin and methoxamine on cardiac function and blood flow distribution in conscious dogs. *Am J Physiol*1976; 231:1579–87.
186. Maturi MF, Martin SE, Markle D, Maxwell M, Burruss CR, Speir E, Greene R, Ro YM, Vitale D, Green MV, Goldstein SR, Bacharach SL, Patterson RE.. Coronary vasoconstriction induced by vasopressin. Production of myocardial ischemia in dogs by constriction of nondiseased small vessels. *Circulation* 1991; 83:2111–21.
187. Hart G, Gokal R. The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion associated with acute myocardial infarction. *Post-grad Med J*1977; 53:761–3.
188. Schafer U, Kurz T, Jain D, Hartmann F, Dendorfer A, Tolg R, Raasch W, Dominiak P, Katus H, Richardt G. Impaired coronary flow and left ventricular dysfunction after mechanical recanalization in acute myocardial infarction: role of neurohumoral activation? *Basic Res Cardiol*2002; 97:399–408.
189. Foreman BW, Dai X-Z, Bache RJ. Vasoconstriction of canine coronary collateral vessels with vasopressin limits blood flow to collateral-dependent myocardium during exercise. *Circ Res*1991; 69:657–64.
190. Sellke FW, Quillen JE. Altered effects of vasopressin on the coronary circulation after ischemia. *J. Thorac Cardiovasc Surg*1992; 104:357–63.
191. Martinez MA, Fernandez N, Climent B, Garcia-Villalon AL, Monge L, Sanz E, Dieguez G. Coronary effects of vasopressin during partial ischemia and reperfusion in anesthetized goats. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 55-63.
192. Dieguez G, Martinez MA, Fernandez N, Climent B, Garcia-Villalon AL, Luis Monge. Vasopressin effects on the coronary circulation after a short ischemia in anesthetized goats. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol*2004; 495: 171– 1.
193. Climent B, Fernández Monsalve N, Sanchez A, García-Villalón AL, Monge L, Dieguez G. Vasoconstrictor prostanoids may be involved in reduced coronary reactive hyperemia after ischemia-reperfusion in anesthetized goats. *Eur J Pharmacol* 2006; 30:234-42.
194. Clozel J-P, Sprecher U. Influence of low perfusion pressure on effect of endothelin on coronary vascular bed. *AmJ Physiol*1991; 260:H893–H901.
195. Wang Y, Kanatsuka H, Akai K, Sugimura A, Kumagai T, Komaru T, Sato K, Shirato K. Effects of low doses of endothelin-1 on basal vascular tone and autoregulatory vasodilation in canine coronary microcirculation in vivo. *Jpn Circ J*1999; 63:617–23.
196. Sharma AC, Singh G, Gulati A, . Decomensation characterized by decreased perfusion of the heart and brain during hemorrhagic shock: role of endothelin-1. *J Trauma* 2002; 53:531–6.
197. Lundberg JM, Ahlgord G, Hemsén A, Nisell H, Lunell NO, Pernow J, Rudehill A, Weitzberg E. Evidence for release of endothelin-1 in pigs and humans. *J Cardiovasc Pharmacol*1991; 17 (Suppl. 7):S350–S3.
198. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Ann Rev Pharmacol and Toxicol*1995; 35:235–55.
199. Fernández N, Martínez MA, García-Villalón AL, Monge L, Diéguez G. Coronary effects of endothelin-1 and vasopressin during acute hypotension in anesthetized goats. *Life Sci.* 2005; 77:423–4.
200. Climent B, Fernández N, Sanz E, Sánchez A, Monge L, García-Villalón AL, Diéguez G. Enhanced response of pig coronary arteries to endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of endothelin receptors, nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol*2005; 524 (1-3):102-10.
201. Skovsted GF, Kruse LS, Larsen R, Pedersen AF, Trautner S, Sheykhzade M, Edvinsson L. Heart ischaemia-reperfusion induces local up-regulation of vasoconstrictor endothelin ETB receptors in rat coronary arteries downstream of occlusion *Brit J Pharmacol* 2014; 171 (11):2726–38
202. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Climent B, Sánchez A, Diéguez G. Effect of ischemia duration and nitric oxide on coronary vasoconstriction after ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2005; 509 (2-3):165-70.
203. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48 (2-3):109-14.
204. Sumiyoshi R, Nishimura J, Kawasaki J, Kobayashi S,

- Takahashi S. Diadenosine polyphosphates directly relax porcine coronary arterial smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:548–56.
205. Sugimura A, Kanatsuka H, Tanikawa T, Ong BH, Shirato K. Effect of diadenosine tetraphosphate (Ap4A) on coronary arterial microvessels in the beating canine heart. *Jpn Circ J* 2000; 64:868–75.
 206. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004;61:498–511.
 207. Kitakaze M, Sekine A, Yamaura T, Nakajima H, Hori M. A novel endogenous vasoactive substance, diadenosine tetraphosphate (Ap4A), produced in the ischemic heart as a new vasodilatory mediator. Abstract. *Circulation* 1995;92 (Suppl. I):38.
 208. Garcia-Villalon AL, Monge L, Fernandez N, Salcedo A, Narvaez-Sanchez R, Dieguez G. Coronary response to diadenosine pentaphosphate after ischaemia-reperfusion in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2009; 81:336–43.
 209. García-Villalón AL, Fernández N, Monge L, Granado M, Carreño-Tarragona G, Figueras JC, Diéguez G. Coronary response to diadenosine triphosphate after ischemia-reperfusion in the isolated rat heart. *Exp Biol Med* (Maywood) 2012; 237 (8):966–72.
 210. Garcia-Villalon AL, Fernandez N, Monge L, Dieguez G. Reduced coronary vasodilatation to diadenosine tetraphosphate after ischemia-reperfusion in isolated rat heart *The FASEB J* 2011;25:1025.
 211. García-Villalón ÁL, Granado M, Monge L, Fernández N, Carreño-Tarragona G, Amor S. Purinergic component in the coronary vasodilatation to acetylcholine after ischemia-reperfusion in perfused rat hearts. *J Vasc Res* 2014;51 (4):283–9.
 212. Julian DG. Treatment of cardiac arrest in acute myocardial ischemia and infarction. *Lancet* 1961; 14 (2):840–4.
 213. Markis JE, Malagold M, Parker JA, Silverman KJ, Barry WH, Als AV, Paulin S, Grossman W, Braunwald E. Myocardial salvage after intracoronary thrombolysis with streptokinase in acute myocardial infarction: assessment of intracoronary thallium-201. *N Engl J Med* 1981; 305:777–82.
 214. Schwartz Longacre L, Kloner RA, Arai AE, Baines CP, Bolli R, Braunwald E, Downey J, Gibbons RJ, Gottlieb RA, Heusch G, Jennings RB, Lefer DJ, Mentzer RM, Murphy E, Ovize M, Ping P, Przyklenk K, Sack MN, Vander Heide RS, Vinten-Johansen J, Yellon DM. New horizons in cardioprotection: recommendations from the 2010 National Heart, Lung and Blood Institute Workshop. *Circulation* 2011; 124:1172–79.
 215. Miura T, Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol* 2008; 103:501–12.
 216. Garcia-Dorado D, Garcia del Blanco B. Door-to-balloon time and mortality. *N Engl J Med* 2014; 370:179.
 217. Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology, Hausenloy DJ, Bøtker HS, Condorelli G, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Heusch G, Lecour S, van Laake LW, Madonna R, Ruiz-Meana M, Schulz R, Joost Sluijter PG, Yellon DM, Ovize M. Translating cardioprotection for patient benefit. *Cardiovasc Res* 2013; 98:7–27.
 218. Takemura G, Nakagawa M, Kanamori H, Minatoguchi S, Fujiwara H. Benefits of reperfusion beyond infarct size limitation. *Cardiovasc Res* 2009; 83:269–76.
 219. Perricone AJ, Vander Heide RS. Novel therapeutic strategies for ischemic heart disease. *Pharmacol Res* 2014; 89: 36–45, 2014.
 220. G. Heusch. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 2015; 116 (4):674–699, 2015.
 221. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–36.
 222. Marber MS, Latchman DS, Malcolm Walker J, Yellon DM. Cardiac Stress Protein Elevation 24 Hours After Brief Ischemia or Heat Stress Is Associated With Resistance to Myocardial Infarction. *Circulation* 1993;88:1264–72.
 223. R. Bolli. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 972–83.
 224. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *The Lancet*. 2013; 381 (9861):166–75.
 225. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285 (2):H579–88.
 226. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112 (14):2143–48.
 227. Yellon DM, Opie LH. Postconditioning for protection of the infarcting heart. *Lancet* 2006; 367 (9509):456–458.
 228. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87 (3):893–9.
 229. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002; 106

- (23):2881–3.
230. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Böttcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S, Lassen JF, Christiansen EH, Krusell LR, Kristensen SD, Thuesen L, Nielsen SS, Rehling M, Sørensen HT, Redington AN, Nielsen TT. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*. 2010; 375 (9716):727–34.
231. Le Page S, Bejan-Angoulvant T, Angoulvant D, Prunier F. Remote ischemic conditioning and cardioprotection: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Basic Res Cardiol* 2015; 110 (2):11-27.
232. Heusch G. Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning. *Compr Physiol* 2015; 5 (3):1123-45.
233. Rochitte CE, Rochitte, Lima JAC, Bluemke DA, MD, Reede SBr, McVeigh ER, Furuta T, Becker LC, Melin JA. Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction. *Circulation* 1998;98 (10):1006–14.
234. Ytrehus K, Liu Y, TsuchidaA, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol* 1994;267 (6 pt 2):H2383–90.
235. Gao E, Boucher M, Chuprun JK, Zhou RH, Eckhart AD, Koch WJ. Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293 (1):H60–8.
236. Doukas J, , Wrasidlo W, Noronha G, Dneprovskiaia E, Fine R, Weis S, Hood J, Demaria A, Soll R, Cheresh D. Phosphoinositide 3-kinase gamma/delta inhibition limits infarct size after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103 (52):19866–71.
237. Spears JR, Prcevski P, Jiang A, Brereton GJ, Vander HR. Intracoronary aqueous oxygen perfusion, performed 24 h after the onset of postinfarction reperfusion, experimentally reduces infarct size and improves left ventricular function. *Int J Cardiol* 2006;113 (3):371–5.
238. Roubille F, Franck-Miclo A, Covinhes A, Lafont C, Cransac F, Combes S, Vincent A, Fontanaud P, Sportouch-Dukhan C, Redt-Clouet C, JNargeot J, Piot C, Barrère-Lemaire S. Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo. *Circulation* 2011;124 (12):1330–6.
239. Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. *Dis Model Mech* 2010;3 (1–2):35–8.
240. Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, Ovize M, Ferrera R. Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288 (6):H2750–5.
241. Krause SM, Clayton FC, Williams DL Jr. Myocardial protection with the non-selective endothelin receptor antagonist L-753, 037 following acute coronary artery occlusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43 (2):214-21.
242. Gonon AT, Bulhak A, Bröijersén A, Pernow J. Cardioprotective effect of an endothelin receptor antagonist during ischaemia/reperfusion in the severely atherosclerotic mouse heart. *Br J Pharmacol* 2005; 144 (6): 860–6.
243. Climent B, Fernández N, García-Villalón AL, Monge L, Sánchez A, Diéguez G. Effects of antagonists for endothelin ET (A) and ET (B) receptors on coronary endothelial and myocardial function after ischemia-reperfusion in anesthetized goats. *Vascul Pharmacol*. 2006; 44 (5):384-90
244. Bibli S-I, Toli EV, Vilaeti AD, Varnavas VC, Baltogiannis GG, Papalois A, Zenon S. Kyriakides ZS, Kolettis TM. Endothelin-B Receptors and Left Ventricular Dysfunction after Regional versus Global Ischaemia-Reperfusion in Rat Hearts. *Cardiol Res and Practice Volume*, 2012 Article ID 986813, <https://dx.doi.org/10.1155/2012/986813>.
245. Tamareille S, Terwelp M, Amirian J, Felli P, Zhang XQ, Barry WH, Smalling RW. Endothelin-1 release during the early phase of reperfusion is a mediator of myocardial reperfusion injury. *Cardiology* 2013; 125 (4):242-9.
246. Rafnsson A, Shemyakin A, Pernow J. Selective endothelin ETA and dual ET (A) /ET (B) receptor blockade improve endothelium-dependent vasodilatation in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Life Sci* 2014; 118 (2):435-9.
247. Adlbrecht C, Wurma R, Pezawasa T, Andreasb M, Redwana B, Distelmaiera K, Kaiderc A, Langa IM. Effects of endothelin A receptor blockade in patients with ST-elevation acute coronary syndrome — A rhythmologic substudy. *Life Sci* 2014; 118 (2):430–4.
248. Parkes DG, Vaughan J, Rivier J, Vale W, May CN. Cardiac inotropic actions of urocortin in conscious sheep. *Am J Physiol* 1997; 272:H2115-22.
249. Brar BK, Stephanou A, Okosi A, Lawrence KM, Knight RA, Marber MS, Latchman DS. CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158:55-63.
250. Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, Yellon DM, Latchman DS. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 8508-14.
251. Huang Y, Yao XQ, Lau CW, Chan YC, Tsang SY, Chan FL. Urocortin and cardiovascular protection. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25:257–65.

252. García-Villalón AL, Sanz E, Monge L, Fernández N, Climent B, Diéguez G. Urocortin protects coronary endothelial function during ischemia–reperfusion: a brief communication. *Exp Biol Med* 2004;229:118–20.
253. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Climent B, Sánchez A, Diéguez G. Mechanisms of the protective effects of urocortin on coronary endothelial function during ischemia–reperfusion in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol* 2005; 145 (4): 490–4.
254. Gordon JM, Dusting GJ, Woodman OL, Ritchie RH. Cardioprotective action of CRF peptide urocortin against simulated ischemia in rat adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H330–6
255. Lawrence KM, Townsend PA, Davidson SM, Carroll CJ, Eaton S, Hubank M, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS. The cardioprotective effect of urocortin during ischaemia/reperfusion involves the prevention of mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:479–86.
256. Hasegawa A, Sato K, Shirai R, Watanabe R, Yamamoto K, Watanabe K, Nohtomi K, Hirano T, Watanabe T. Vasoprotective Effects of Urocortin 1 against Atherosclerosis In Vitro and In Vivo. Ed. Gianfranco Pintus. *PLoS ONE* 9. 12 (2014): e110866. PMC. Web. 28 Sept. 2015.

Conflicto de intereses.

Ninguno.

Agradecimientos.

Experiments from our laboratory were supported by grants from Comunidad de Madrid; Ministerio de Educación y Ciencia; Ministerio de Ciencia y Tecnología, Instituto Salud Carlos III, Fundación Eurgenio Rodríguez Pascual, and Fundación Mutua Madrileña.



New concepts on the functionality of the nervous system: the revolution of the glial cells. II. Glial responses keys in the pathogenesis and treatment of diseases of SN

Title in Spanish: *Nuevos conceptos sobre la funcionalidad del sistema nervioso: la revolución de las células gliales. II. Las respuestas neurogliales claves en la patogenia y el tratamiento de las enfermedades del SN*

Adolfo Toledano^{1,2,*}, María-Isabel Álvarez¹, Adolfo Toledano-Díaz³, José-Julio Rodríguez-Arellano^{4,5}

¹Instituto Cajal, CSIC Madrid. ²Académico correspondiente RANF. ³Departamento Reproducción, INIA, Madrid Madrid, Spain. ⁴Centro Achúcarro de Neurociencia, IKERBASQUE, Fundación Vasca para la Ciencia, Bilbao.

⁵Departamento de Neurociencia, Universidad del País Vasco UPV/EHU y CIBERNED, Leioa, Bilbao

ABSTRACT: All members of the families of the neuroglia have the ability to adopt a reactive state ("gliosis" in general, "astrogliosis" "oligodendrogliosis" and "microgliosis" in its specific form) face to situations where importantly is modified homeostasis of the nervous tissue and / or normal functional dynamics of neurons and their accompanying neuroglial cells (trauma, neurotoxicity, infections, neurodegenerative processes). In this reactive state, neuroglial cells become "new cells with new functions" because a significant change of their cellular functions occurs, mainly by the expression of new genes. Thus they become major players on the different stage of the new SN pathological situations. Activation of neuroglia cells is initially beneficial, aiming to solve the pathological changes, but it can turn detrimental to nerve tissue. Also, in recent years, it has been found that also the lack of reactive responses or the existence of "maladaptative responses" of the different neuroglial cells as well as the involution or regression of these cells, are important sources of nervous pathology. Studies of these different types of reactive glial cells have significantly expanded the knowledge we had about the pathogenesis of diseases of the SN. Moreover, many studies are revealing that they may be important to define new therapeutic drug targets or create new cell therapies to control the progress of the "pathogenic cascades", through activating neuroprotection-neurorepair and/or inhibiting the neurotoxicity-neurodegeneration.

RESUMEN: Todos los miembros de las familias de la neuroglía tienen la capacidad de adoptar un estado reactivo ("gliosis" de manera general; "astrogliosis", "oligodendrogliosis" y "microgliosis", en su forma más específica) ante situaciones en que se modifica de manera importante la homeostasis del tejido nervioso y/o la dinámica funcional normal de las neuronas y sus células gliales acompañantes (traumas, intoxicaciones, infecciones, neurodegeneraciones). En este estado reactivo se convierten en "nuevas células con nuevas funciones" pues cambian de manera importante sus funciones celulares con la expresión de nuevos genes. De esta forma pasan a ser actores principales en el escenario de las nuevas situaciones patológicas del Sistema Nervioso (SN). La activación de las células de neuroglia en principio es beneficiosa, tendente a solucionar los cambios patológicos, pero puede convertirse en perjudicial para el tejido nervioso. Asimismo, en los últimos años, se ha comprobado que también es causa de patología la falta de respuesta reactiva de las distintas células neuróglicas o la involución de estas células. Los estudios sobre estos diferentes tipos de células gliales reactivas han ampliado de manera muy importante los conocimientos que teníamos sobre la patogenia de las enfermedades del SN, y también nos están dando a conocer que pueden ser apoyos fundamentales para definir dianas farmacológicas terapéuticas o crear nuevas terapias celulares que ayuden a controlar el avance de las "cascadas patogénicas" por la vía de activar la neuroprotección-neurorreparación y/o inhibir la neurotoxicidad-neurodegeneración.

*Corresponding Author: atoledano@cajal.csic.es

Received: Mars 10, 2016 Accepted: April 15, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 1 (2016), pp. 51-67

Language of Manuscript: Spanish

1. LAS RESPUESTAS GLIALES: ESPECIFICIDAD, VARIABILIDAD Y SIGNIFICADO EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO (SN)

1.1. Neurogliosis e involución neuroglial

Todas las familias de células gliales tienen en común una gran capacidad de adaptación morfológica y funcional

para cumplir con su función fisiológica de la manera más óptima (glioplasticidad). Esto fue expuesto en la primera parte de esta revisión (1). Pero, además, poseen una gran capacidad de reacción ante insultos, agresiones o lesiones del tejido nervioso o a cambios del medio interno para contrarrestar los efectos nocivos sobre las neuronas a las que acompañan, protegen y tutelan. Al activarse en estas

situaciones, las células gliales se transforman en lo que pudiéramos denominar “nuevos elementos con nuevas propiedades” (“células (neuro) gliales activadas” o “reactivas”; células “glióticas”) ya que generalmente muestran cambios mucho mayores, morfológicos y funcionales, incluidos cambios notables en la expresión génica habitual y la expresión de nuevos genes. Este fenómeno de activación que se denominó “gliosis” o “neurogliosis”.

Ya desde los primeros estudios neuropatológicos llevados a cabo en diversas enfermedades cerebrales (orgánicas o mentales) se concedió gran importancia a los cambios sufridos por las células neurogliales (2-9). Se describieron modificaciones en el número de células gliales y/o en su morfología y/o en su tinción inespecífica, como la mostrada con las impregnaciones metálicas (Figuras 1 y 2). Más modernamente, con marcajes celulares específicos (inmunotinciones, pruebas de expresión génica, autorradiografía de receptores, etc.), se mostraron las alteraciones moleculares subyacentes (10-24). Estos cambios gliales se consideró que eran consecuencia de la “activación” o “reactividad”, espontánea o inducida, de las células gliales (de todas o sólo de ciertos elementos), y que, además, estaban relacionados con las alteraciones neuronales propias de los distintos procesos patológicos del SN, por lo que debían de ser tenidos muy en cuenta para explicar los cambios neuropatológicos globales. Así, la “gliosis” pasó a ser una de las características principales del tejido “no normal” (patológico, lesionado o agredido) con independencia de su posible significación fisiopatológica, es decir, tanto si sus modificaciones estuvieran destinadas a proteger las

neuronas en riesgo o a reparar el tejido y/o la función de los circuitos dañados por cualquier causa (heridas, traumas, infecciones, lesiones cerebrovasculares, intoxicaciones, etc.), como si su principal efecto fuera desentenderse de proteger a las neuronas e, incluso, aniquilar las unidades neuro-glio-vasculares que acababan sucumbiendo (como ocurre en enfermedades neurodegenerativas, procesos cerebrovasculares o cáncer) (10-24).

Los cambios reactivos, morfológicos y funcionales de las células de las tres familias de la neuroglía (astroglía, oligodendroglía, microglía) son específicos de cada familia glial, aunque sean compartidas algunas características generales, como la hipertrofia o la hiperplasia, pero no son específicos de un tipo determinado de alteración del SN, ya que muchas células reactivas de una familia glial se pueden encontrar con idénticas características en muy diferentes situaciones patológicas (lesión, intoxicación, anoxia, degeneración, etc.) (10-12, 16-19, 21-23). Cuando se estudian los cambios con detalle, se comprueba que son muy variados dentro de cada familia, tanto considerados de manera general como en el contexto de cada situación anómala del SN o en el curso de un proceso patológico. Sin embargo, se pueden definir unos “patrones” generales bastante específicos de reactividad neuroglial en cada región del SN, en cada proceso y en cada momento de su evolución, y casi, en cada individuo afectado por un mismo proceso (12, 16, 17). También hay que incluir dentro de los posibles cambios una atrofia o hipoplasia de algunos elementos gliales, tal como se ha descrito en algunos trabajos recientes (21-29).

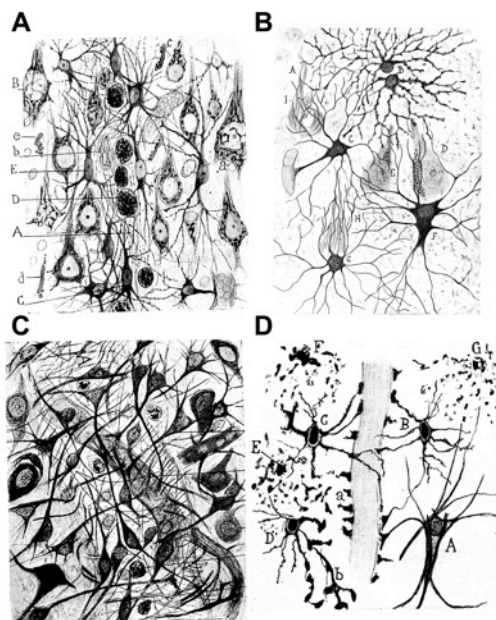


Figura 1. Astrogliosis. Dibujos clásicos de Cajal y sus discípulos sobre células astrogliales reactivas observadas tras impregnaciones metálicas. **A-** astrocitos hipertróficos en estrecha relación con neuronas normales y alteradas en una lesión cortical. También existen otras células neurogliales con escasas prolongaciones que más tarde fueron calificadas de célula microgliales [3,6]. **B-** Astrocitos hipertróficos

protoplasmáticos (B) y fibrosos (C,F,G) en el hipocampo de un caso de “demencia senil” (Enfermedad de Alzheimer) [7]. **C-** Astrocitos hipertróficos formando una cicatriz glial [6]. **D-** Diferentes tipos de astrocitos “reactivos” en la parálisis general progresiva: astrocito hipertrófico (A); astrocitos “involutivos” que sufren un proceso de “*klasmatodendrosis*” [4,7].

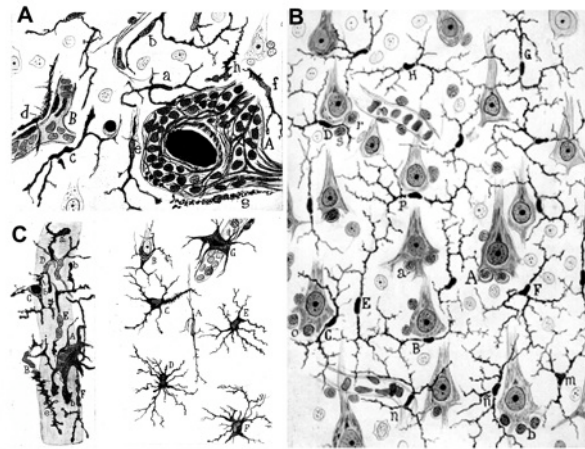


Figura 2. Microgliosis. Dibujos clásicos de Cajal y sus discípulos de células neurogliales reactivas [6]. **A-** Elementos neurogliales hipertróficos en forma de “bastoncillos” con largas prolongaciones en el parénquima nervioso (E) y “células redondeadas” (macrofágicas) que invaden los espacios pericapilares de Virchow-Robin antes de penetrar en el parénquima nervioso y convertirse en células microgliales “reclutadas”. **B-** Microgliosis cerebral tras un traumatismo [4, 5]. **C-** Microglia hipertrófica con prolongaciones [5].

1.2. Los mecanismos de neurogliosis

Los mecanismos celulares y moleculares puestos en funcionamiento para llevar a cabo la transformación en células activadas o reactivas (“glióticas”) pueden ser similares a los cambios plásticos/adaptativos (cambios debidos a la “glioplasticidad”) que se observan en la dinámica normal de las células gliales y que se comentaron en la primera parte de esta revisión (1, 30). Estos cambios tienen por objeto cumplir con su función de mantenimiento y cooperación con las neuronas, optimizando de esta manera la función del SN. A veces se aprecian variaciones en intensidad y/o en el tiempo de actuación o de respuesta de estos mecanismos (30). Otras veces existen respuestas no habituales (especialmente llamativas cuando se producen nuevas moléculas neuroactivas), que son las que mayoritariamente dan razón de esa transformación en lo que más arriba hemos considerado “nuevos elementos con nuevas propiedades” (14-17, 19-23).

1.3. El significado de la neurogliosis

El significado fisiopatológico de estos cambios neurogliales es muy difícil de analizar y las conclusiones a las que se llega suelen ser discutibles (30). En general, los resultados de los estudios se interpretan de muy diferente manera, lo que da lugar a grandes diferencias descriptivas entre los autores. De todas formas, se considera casi de manera unánime que los efectos de estos cambios gliales sobre las neuronas pueden ser muy diversos, incluso contradictorios (10-12, 27-30). De una manera muy general, se puede teorizar que los cambios consecutivos a la glioplasticidad tienen un efecto neuroprotector (1), pero la falta de adaptación glial a los cambios neuronales o al medio ambiente neuronal, o la falta de adecuación de los cambios adaptativos gliales (“*maladaptive responses*” o “*maladaptive glioplasticity*”) pueden ser el origen o el

agravamiento de una patología del SNC (30, 31). Mientras tanto, la gliosis reactiva ante los cambios neuronales o del medio ambiente neuronal, puede ser, teóricamente, de tipo mucho más diverso: puede producir efectos neuroprotectores, neuroreparadores, neurotóxicos o mixtos (10, 11, 22, 23, 26, 30, 31). Muchas veces, los cambios sólo se interpretan en relación a la solución final del proceso patológico en el que tienen lugar, de manera que la actuación de las células de astro-, oligo- o microglía se tipifica de “beneficiosa” o “tóxica”, “buena” o “mala”, “neuroprotectora/reparadora” o “neurodegeneradora”, según si las neuronas de la región del tejido nervioso afectado, y en última instancia, el individuo que padece el proceso, sobreviven o logran superar, o no, el proceso patológico (30). Y debe entenderse que superar el proceso patológico puede implicar la destrucción de neuronas muy dañadas para eliminar sus efectos tóxicos y promover la reparación de las neuronas sobrevivientes y reforzar los circuitos neuronales para suplir los perdidos. En resumen, en algunas circunstancias los cambios gliales protegen a las neuronas o reparan los daños sufridos en los circuitos neuronales; en otras circunstancias, los cambios gliales son mecanismos inductores o coadyuvantes en la presentación y avance de la patogenia. Estudios focalizados sobre determinados aspectos de un proceso patológico, en una región concreta del SNC y en una fase concreta del proceso patológico, son los únicos que pueden informarnos con exactitud sobre la implicación de cada tipo de célula de neuroglia y de su efecto en cada patología.

La complejidad del proceso patológico es determinante para permitirnos llegar a conocer el papel que tienen las células gliales implicadas. Procesos relativamente sencillos de lesión-reparación/degeneración son más fáciles de estudiar y explicar. Cajal y sus discípulos nos describieron los cambios que sufren las neuronas tras una lesión

axónica, junto con los cambios (en el número y la morfología) de las células neuróglas acompañantes, tanto si degenera la neurona como si logra reparar el axón (6). En estudios sobre lesiones localizadas del SN, accidentales o experimentales, las modificaciones gliales se describen de manera secuencial en el tiempo y en la forma: en primer lugar, en la zona lesional y peri-lesional (reacciones “locales” y “proximales”) y posteriormente en la zona inervada por las neuronas directamente afectadas (reacciones gliales “remotas”) (32, 33). Como ejemplos se

muestran en las Figuras 3, 4 y 5 tres esquemas sobre lesión focal en la corteza cerebral frontoparietal, lesión experimental más amplia de la corteza entorrinal y lesión en el núcleo *basalis magnocellularis*, todas ellas en rata (32,33). Con todas estas observaciones se pueden explicar con bastante exactitud las funciones de los elementos gliales acompañantes de las neuronas lesionadas (eliminación de residuos celulares, activación neuronal, reconstrucción/remodelación de sinapsis y circuitos, etc.).

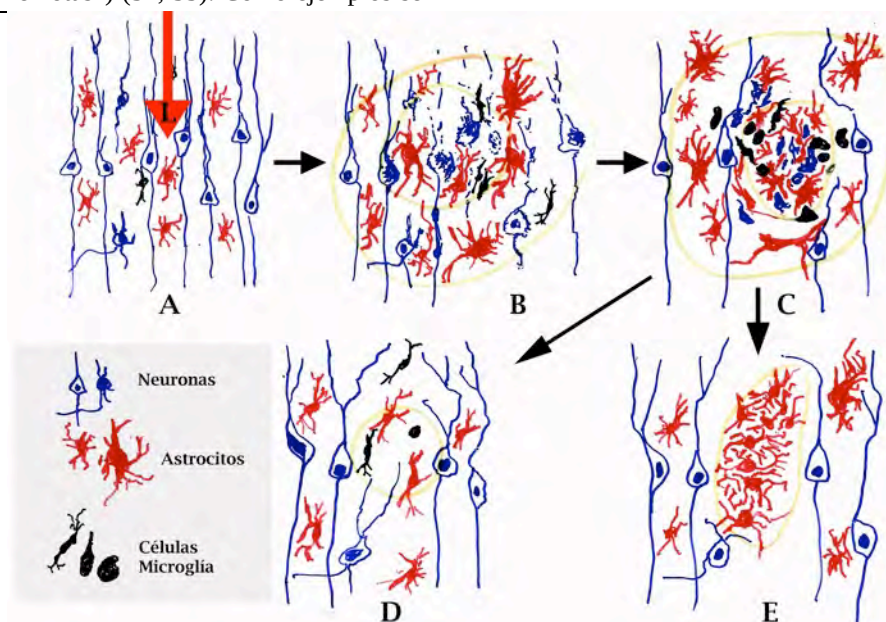


Figura 3. Lesión local (traumática, tóxica, infecciosa, cerebrovascular) en un área muy reducida de la corteza frontoparietal de la rata. Se origina una rápida reacción astrogliar, de grado variable en relación con la intensidad y el tipo del agente agresor, la lesión vascular, el grado de anoxia/hipoxia, el grado de destrucción/distrofia de las neuronas, los cambios que la homeostasis del área, etc. (A). Rápidamente, se delimita una zona central, cuyo destino suele ser la necrosis, y una zona periférica (“penumbra”) que participa en la regeneración y es capaz de recuperar gran parte de la funcionalidad del área dañada; en ambas se observan astrocitos glióticos (B). Células de astroglia de la zona periférica actúan de manera secuencial en la recuperación de la homeostasis, regulación de la neurotransmisión, recuperación de las neuronas y eliminación de detritus celulares (C), llegando casi a desaparecer las señales de la lesión (D). Células de microglía reactivas colaboran en este proceso de resolución de la lesión (ver neuroinflamación). En muchas de las zonas quedan como recuerdo de la lesión/difunción una acumulación de astrocitos hipertróficos que se conoce como cicatriz o escara glial (E). Los cambios que se producen en las células astrogliales en las zonas central y periférica de cada lesión varían con el tiempo, según la evolución de la lesión, tanto en sus primeras fases como en fases más avanzadas.

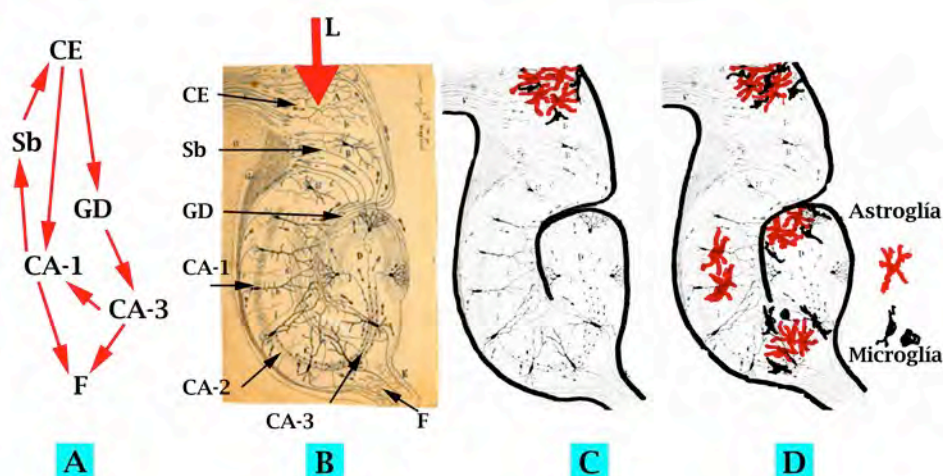


Figura 4. Lesión experimental de intensidad moderada-grave de la corteza entorrinal de la rata. A Esquema de las conexiones sinápticas

de la corteza entorrinal con las áreas del hipocampo y **B** esquema de Cajal sobre las regiones morfofuncionales del hipocampo. Tras la lesión, se aprecia únicamente en el área lesionada cambios astrogliales similares a los descritos en la Figura 3 (C). Además en una fase más avanzada (días), se aprecian cambios astrogliales en las zonas conectadas sinápticamente (**D**). L=lesión; CE= corteza entorrinal; Sb= subiculum; GD= *girus dentatus*; CA-1, CA-2; CA-3= áreas del hipocampo denominadas *cornu ammoni* 1,2 y 3.

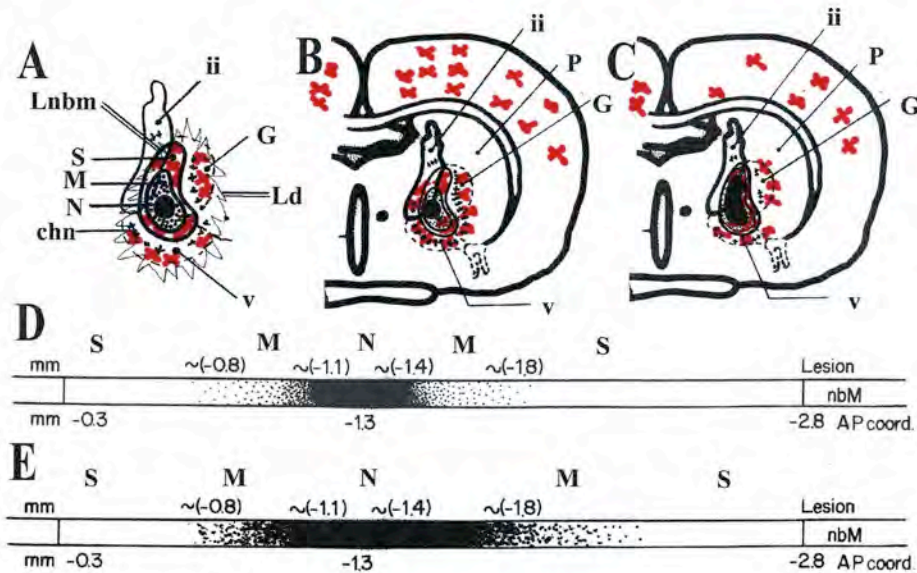


Figura 5. Lesión experimental del núcleo *basalis magnocellularis* (nbm) de la rata con inyecciones estereotóxicas de excitotoxinas (60 nmoles en **B** y 30 nmoles en **C** de ácido Quisculáico). El nbm es el equivalente al núcleo de Meynert del hombre que proporciona la red de innervación colinérgica cortical y cuya involución puede ser causa de la Enfermedad de Alzheimer. **A.** La inyección produce un “núcleo” necrótico con áreas periféricas de baja (M) y alta (S) supervivencia de neuronas junto a reacción astrogliar en toda la zona. En áreas “proximales” (cápsula interna- ii; *globus pallidus* -G; área subpalidal- chn), entre los límites del nbm (Lnbm) y el límite difuso (Ld) donde se acaban de apreciar neuronas colinérgicas y no colinérgicas alteradas, se observa el mayor grado de astrogliosis, que persiste durante varios meses, apreciándose algunas zonas con cicatrices gliales. La desinnervación colinérgica de la corteza ocurre en 6-48 horas, se observan astrocitos reactivos en la corteza ipsilateral a los varios días (14-30) de la lesión, manteniéndose la gliosis durante casi toda la vida (hasta 24 meses en muchos casos, sobre todo en las lesiones más intensas (**B**). Modificado de (32).

Sin embargo, en el tejido nervioso en degeneración fisiológica senil o por procesos patológicos complejos (como en las enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, demencia frontoparietal, Parkinson, etc.), donde existen cambios importantes del medio interno y alteraciones graves de las neuronas y los circuitos neuronales, es mucho más difícil interpretar lo que realmente hacen las células gliales, directa o indirectamente. Observamos únicamente sus cambios morfológicos y bioquímicos, los aumentos o disminuciones en número de células de un determinado tipo o subtipo, los cambios de relaciones con las nuevas estructuras patológicas (somas neuronales, dendritas o axones distróficos o atróficos; acumulaciones aberrantes de sustancias amiloides o priónicas en el neuropilo; etc.) y la producción de sustancias neuroactivas (8-11, 27, 28, 30). En ciertos procesos consideramos que el efecto es beneficioso (neuroprotector, reparador), en otros parece claro que se está causando un daño a las neuronas y a los circuitos neuronales, y en otros parece que el efecto es variable o ambivalente según las circunstancias. Los productos generados por las células gliales, muchos de ellos no presentes en el tejido “normal”, en principio se puede considerar que actúan de una manera definida: las neurotrofinas activan y/o protegen a las neuronas y las

citoquinas/quimioquinas producen efectos neurotóxicos. Sin embargo, es bien conocido el papel tóxico de algunas neurotrofinas en situaciones concretas y el papel neuroprotector de algunas citoquinas. En conjunto se puede afirmar que las células gliales y los productos que originan presentan acciones duales neurotóxicas/neuroprotectoras según los momentos y lugares en donde actúan y la situación global del tejido o la específica de las neuronas a las que acompañan (11, 21-23, 29, 30). Esta dualidad de efectos antagónicos se ha señalado repetidamente en el estudio de otros elementos de vías de señalización celular operativas en procesos inflamatorios, neuroprotectores y/o neurodegenerativos (isoformas de COX y NOS, NGF, etc.) en donde claramente están implicados las células gliales (34).

1.4. La neurogliosis y la involución neuroglial en las enfermedades del SNC

En muchas teorías sobre la patogenia de las enfermedades del SNC, como es el caso de la EA, se acusa a las células de la neuroglia (especialmente las de microglía) de ser los elementos celulares primarios en el desencadenamiento de la cascada patogénica por su activación extemporánea y aberrante, fuera de la cooperación neuroglial que es la base del funcionamiento

normal del SN, quizás por su capacidad de producir cito y quimioquinas neurotóxicas (11-17, 20-23, 30). Sin embargo, algunos autores han señalado la posibilidad de que estos procesos se deben a una disminución en los componentes gliales que cooperan en el mantenimiento de las neuronas o bien a la disfunción de estas células inducidas por sustancias diversas que producen diferentes alteraciones de la expresión génica y de sus funciones plásticas, o aberraciones en la activación glial (27-29). Pero quizá los posibles agentes que inducen la patogenia atacan en primer lugar las células gliales, o algún tipo de célula glial. En diversas regiones muy afectadas por los cambios neuropatológicos se ha podido observar la disminución de los componentes gliales. Esto podía ser interpretado también como una emigración de las células gliales de las zonas ya irrecuperables hacia otras zonas donde todavía existe componente neuronal necesitado de cooperación para una posible supervivencia (30, 35).

En los siguientes apartados se analizan resumidamente las respuestas de las distintas familias gliales.

2. RESPUESTAS DE LAS CÉLULAS DE ASTROGLÍA

2.1. Astrogliosis: Hipertrofia e hiperplasia

La astrogliosis (o sencillamente denominada “gliosis” en muchos trabajos) fue definida hace muchos años como la hipertrofia, hiperplasia e hiperproducción de gliofibrillas de las células de la astrogliá (7-9). Las formas más características de astrogliosis se describieron en la senilidad fisiológica, la “demencia senil” (Alzheimer) y la parálisis progresiva (3, 4, 7-9) (Figura 1). En general, se considera que el rasgo característico más definitorio de esta gliosis es la hipertrofia o hiperdensidad de gliofibrillas (tanto si existe o no hipertrofia celular como si existe o no hiperplasia) (29, 30, 32, 35) demostrada con impregnaciones metálicas o, más modernamente, con la hiperreactividad frente a la proteína glial fibrilar acidófila (PGFA) (o GFAP, “*glial fibrillar acidofic protein*”). Esta inmunotinción aumenta en astrocitos reactivos aunque no se evidencie aumento de gliofibrillas (forma soluble de la proteína). También existen astrocitos reactivos con bajo contenido de PGFA (30, 35) (Figuras 6-9). Sin embargo, actualmente parece que se tiende a exigir modificaciones moleculares o funcionales de más trascendencia para considerar que un astrocito es reactivo (10, 30, 35). Recientemente se ha definido la astrogliosis (o gliosis reactiva astrocitaria) como una reacción defensiva astrogliá, constitutiva de estas células, conservada durante la evolución, que comprende diferentes estadios y grados de respuesta (28) a lo que podíamos añadir que está

regulada por factores intrínsecos (neuronales, gliales y homeostáticos) y extrínsecos al SN y en cuyo proceso se producen diferentes sustancias neuroactivas y gliactivas (30). Ello implica que tengamos que considerar la posible existencia de muchos tipos (fenotipos) de células astrogliales reactivas, tanto morfológica como (en especial) funcionalmente, incluyendo incluso la posibilidad de una neo-proliferación astrogliá (hiperplasia) que conduzca a tipos celulares diferentes a los derivados de los astrocitos normales residentes en el área del SN afectada (es decir, podrían existir distintas poblaciones de células astroglióticas derivadas de astrocitos pre-existentes así como de astrocitos neoformados).

En la mayoría de los trabajos se usa el término “(astro)gliosis” cuando se observan astrocitos hipertróficos o normotróficos hiperinmunoteñidos con anticuerpos contra GFAP, sin considerar otros parámetros morfofuncionales como el incremento del número de células (hiperplasia) con o sin inmunoreactividad contra GFAP, el porcentaje de células reactivas, el tipo de cambios acaecidos en su cuerpo celular o en sus prolongaciones, la hiperproducción de sustancias activadoras neuronales o la existencia de síntesis de nuevas sustancias neuroactivas (neurotrofinas, citoquinas o quimioquinas). Realmente los cambios morfológicos en el número y tipo de los procesos gliales y en el número de células así como los cambios en los efectos neuronales, o bien no son estudiados o pueden pasar desapercibidos, especialmente cuando los astrocitos son GFAP negativos o débilmente positivos (35).

Para entender la “astrogliosis” que ocurre en cada momento en cada región del SNC, tanto si se trata de un proceso patológico localizado, como un trauma focal, como general del SNC, como una enfermedad neurodegenerativa, hay que analizar los diferentes tipos de células gliales existentes, la desorganización glial dentro de la citoarquitectura propia de la región y las respuestas morfofuncionales de cada elemento glial. Si analizamos en profundidad y con detenimiento los cambios observados en diferentes situaciones patológicas se pueden poner de manifiesto diferentes “patrones” de (astro)gliosis que, pueden tener importantes implicaciones en la patogenia y en la terapéutica. En el cerebelo, hemos observado como existen diversos tipos y subtipos de células astrocitarias que presentan diferentes grados de hipertrofia en su cuerpo y prolongaciones y de inmuno-reactividad contra GFAP en la senilidad fisiológica y en la Enfermedad de Alzheimer (35).

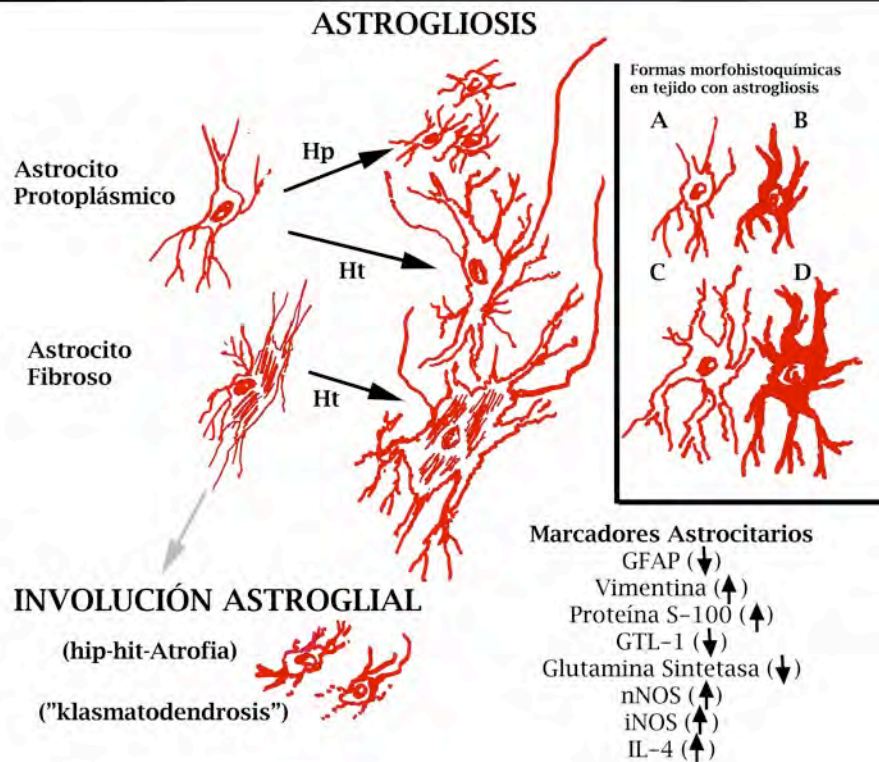


Figura 6. Astrogliosis. Involución astrogliar. Los astrocitos protoplasmáticos y fibrosos sufren un proceso de activación (astrogliosis) en respuesta a diferentes situaciones (trauma, neurotoxicidad, infección, degeneración etc.) que se caracteriza por varios fenómenos: hiperplasia (Hp), hipertrofia (Ht), aumento de contenido de proteína glial fibrilar acidófila (PGFA o GFAP por su nombre inglés *glial fibrillar acidific protein*) y de otros marcadores astrocitarios, (vimentina, proteína S-100, etc.). Así mismo, se pueden alterar marcadores como glutamino sintetasa o el transportador de glutamato (GTL-1) relacionadas con la neurotransmisión glutamatérgica. La hiperreactividad de PGFA se considera signo de astrogliosis, pero muchas células reactivas, sobre todo las nuevas formas hiperplásicas, tienen muy escasa o nula inmunoreactividad. En algunos casos, la hipertrofia se manifiesta con aumento de largas prolongaciones. Tanto si los astrocitos son protoplasmáticos como fibrosos, como si se evidencian numerosos o escasos "paquetes" de gliofibrillas, en caso de astrogliosis aumenta la inmunoreactividad ante PGFA, pero no existe buena correspondencia entre subtipo de astrocito, grado de reactividad funcional e inmunopositividad frente a PGFA. Esto se ocurre especialmente en el envejecimiento fisiológico y las enfermedades neurodegenerativas, donde se observan astrocitos normotróficos-normorreactivos (A); normotróficos-hiperreactivos (B); hipertróficos-normorreactivos (C), e hipertróficos- hiperreactivos (D). La astroglia puede sufrir también una involución ("senescencia" "asternia") que se manifiesta por hipoplasia (hip); hipotrofia (hit) o atrofia. Signos morfológicos de involución ("klasmatodendrosis") fueron ya descritos por Cajal (ver Figura 1).

2.2. Significado de la astrogliosis y variaciones en su presentación

La astrogliosis, tal como se dijo más arriba, tiene diferentes significados en cuanto a su función neuroprotectora/neurorreparadora o neurotóxica. Pero además, muchos aspectos de la reactividad astrogliar nos plantean otras cuestiones fisiopatológicas todavía no resueltas como son la existencia o no de diferentes subtipos/subconjuntos de células astrogliales con diferente capacidad para la gliosis (que pueden coexistir con los diferentes grados o niveles de respuesta de cada elemento astrogliar) o la existencia tanto de una respuesta astrogliar generalizada y organizada (homogénea en cada elemento de un subtipo glial) en una región del SN, como de respuestas astrogliales desorganizadas (heterogéneas en cada elemento de un subtipo glial) que parecen responder más a erráticos comportamientos de cada célula astrocitaria en esa región del SN (30). En algunas

situaciones patológicas experimentales se puede apreciar una respuesta generalizada de todos los elementos gliales de amplias regiones del SNC (generalmente hiperinmunoreactividad contra GFAP, tal como se muestra en la Figura 7 en un modelo de intoxicación por pilocarpina (30)) sin que parezca existir hiperplasia ni alteraciones glioarquitectónicas significativas, mientras que en la mayoría de los casos la respuesta astrogliar dentro de esas mismas regiones es variable. De manera casi constante existen diferentes elementos morfohistoquímicos astrocitarios (normotróficos-normorreactivos, normotróficos-hiperreactivos, hipertróficos-normorreactivos, hipertróficos-hiperreactivos. Figura 6). Esta variabilidad es entendible en algunas situaciones patológicas cuando depende de cambios del medio ambiente de esas áreas, tal como ocurre en las diversas zonas periféricas a una lesión focal que puede cursar hacia la destrucción de una parte del tejido nervioso y/o a la formación o no de una cicatriz glial

permanente (Figura 3). Por el contrario, no es fácil de explicar la variabilidad en la reacción astrogliar de muchos de los procesos generalizados del SNC, como ocurre en los procesos neurodegenerativos que siempre muestran elementos dispersos glióticos de variable intensidad (Figuras 6 y 7). En este caso, donde además existe un variable grado de hiperplasia, hipertrofia, distrofia y atrofia de las células astrogliales, y parece más que existe una respuesta neuro-glial a cambios micro-locales, de mayor o menor intensidad, que se solapan e interfieren, y que afectan de diferentes maneras no sólo a los astrocitos y otras células gliales, sino a neuronas y a sus conexiones, dando lugar a deterioros importantes de los circuitos neuronales (35).

2.3. Patrones característicos de reactividad glial en algunas patologías del SN

Existen algunos “patrones” de reacción astrogliar en muchas capas o subregiones del SN que se consideran bastante característicos de algunas situaciones patológicas del SN. Con frecuencia se describe en la capa I y II de la corteza cerebral una mayor (astro)gliosis en la enfermedad de Alzheimer y en la de Creutzfeldt-Jakob (30) (Figura 7). En la corteza cerebelosa, en los procesos neurodegenerativos existe una mayor hipertrofia-hiperreactividad en las zonas de transición entre las capas

(sustancia blanca –capa de los granos; capa de los granos/capa de Purkinje/capa molecular, (35) – Figuras 8 y 9). Esta mayor reactividad en la transición de las capas también se observa en el hipocampo. Además, en estas zonas se puede apreciar hiperplasia de elementos de subtipos específicos de la zona que tienen una muy variable inmunorreactividad contra GFAP tal como se comentará más adelante. En algunas zonas como las capas moleculares del hipocampo y la corteza cerebelosa, se tejen las prolongaciones hipertróficas astrocitarias formando unas “redes” (“networks”) muy características (Figura 7) (35). También se puede observar que se delimitan en ciertos centros del SNC unos “espacios gliales” formados por acumulación de procesos cortos hipertróficos de astrocitos (Figura 9). El espesor alcanzado por estos acúmulos permite su observación a nivel de la MO, cuando las finas prolongaciones de la astrogliar normal no son apreciables (35). En situaciones especiales, probablemente porque existen factores locales inductores de una mayor gliosis, puede ocurrir que elementos hipertróficos de unas capas invadan otras a las que normalmente no llegan sus prolongaciones. Esto ocurre, por ejemplo, con astrocitos velamentosos de la capa de los granos del cerebelo que invaden las capas de Purkinje y molecular (Figura 9) (35).

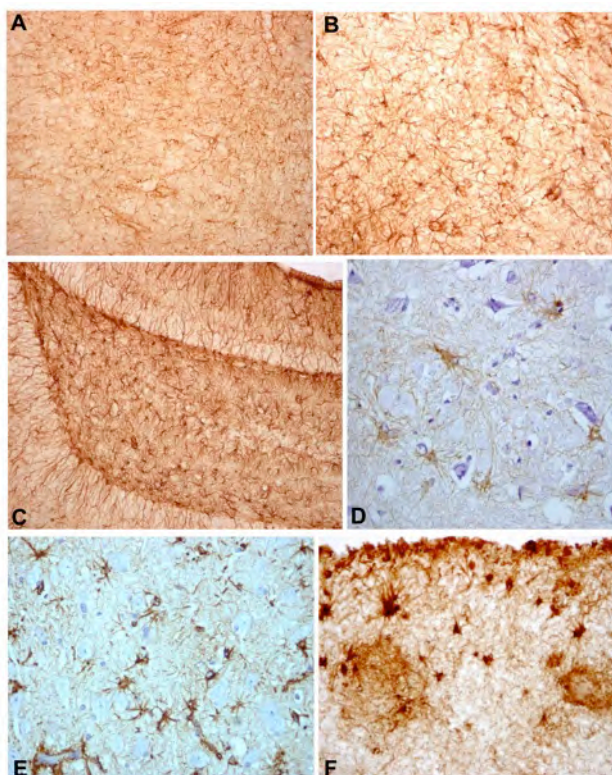


Figura 7. Astrogliosis. A-C. Astrogliosis generalizada en rata por pilocarpina (25mg/Kg, 24 h antes del sacrificio), A- Red astrocitaria normal en corteza frontoparietal de la rata no tratada. B. Corteza de rata tratada. C. Hipocampo de rata tratada. D-F. Astrogliosis en córtex frontal humano. D. Astrocitos reactivos que rodean placas seniles. Astrocitosis en la senilidad fisiológica. F Diferentes tipos de astrocitos glióticos (con mayor o menor hipertrofia y distinto grado de inmunorreactividad frente a PGFA) en la corteza de un caso de Enfermedad de Alzheimer. A-C = x 60; D = x 180; E-F = x 60.

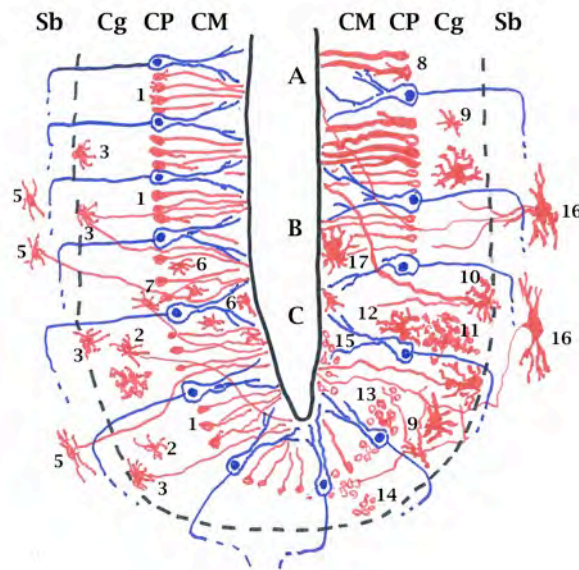


Figura 8. Esquema sobre los cambios astrogliales observados en el cerebelo humano en la senilidad fisiológica y en la Enfermedad de Alzheimer (EA). En el lado izquierdo se esquematiza la situación en el adulto (18-50 años) y en la derecha en la senilidad y EA (>65 años). En el adulto normal, en la capa molecular se evidencia una “empalizada” de fibras homogéneas (las fibras de Bergmann, que son las prolongaciones de las células de la glía epitelial de Golgi, tipo específico de astrocito en el cerebelo) (1). En la capa de los granos se observan astrocitos de tipo estrellado o “velamentoso” (2), siendo algunos específicos de la transición capa de los granos/substancia blanca (CG/Sb) (3) o la de capa de los granos/capa de los granos/capa de Purkinje y molecular (7). También existen tipos específicos en la substancia blanca (5) y en la capa molecular (6). Algunas de todas estas células (2 a 7) mandan algunas prolongaciones largas a la capa molecular simulando fibras de Bergmann (perpendiculares a la superficie glial) o siendo normales a estas últimas (fibras de Weigert). En envejecimiento y EA, se aprecian muchos astrocitos glióticos (hipertróficos y/o PGFA-hiperreactivos) pero también existe hiperplasia (generalmente hiporreactiva) e involución astrogliar (hipoplasia, involución glial o PGFA- hiporreactividad); Fibras de Bergmann hipertróficas (8); astrocitos hiperreactivos normotróficos (9) en la capa de los granos e hipertróficos hiperreactivos en la transición de capas y en el espesor de todas las capas (10-12) así como en la substancia blanca (16) y zona subpial (17). Existen focos de hiperplasia a nivel de la capa de Purkinje (13), capa de los granos (14) y zonas subpiales (15). Aumentan las fibras largas de los astrocitos fibrosos y se manifiesta en algunas áreas de la molecular un complejo entramado de fibras de Veirgert paralelas a las superficie pial. Existen áreas de diversa reactividad frente a PGFA (ver Figura 9): de alta gliosis (A) de gliosis similar al adulto (B) y de muy baja reactividad (C) aunque células aisladas de cualquier subtipo sean altamente hiperactivas. Modificado de (35).

A pesar de esta existencia de patrones de reactividad glial, en muchos casos, incluso en procesos sistémicos o generalizados del SNC, como los procesos neurodegenerativos, lo más llamativo son respuestas focales de variable intensidad en capas y/o subregiones del SNC (30). En diversas áreas de capas de las cortezas cerebrales y cerebelosa se puede apreciar focos más o menos extensos de astrogliosis que son detectados por aumento de un tipo de elementos gliales o bien por la presencia de grandes elementos hipertróficos-hiperactivos. Algunas veces coexisten con otros signos neuropatológicos propios de la enfermedad (p.e., acumulaciones de amiloide y existencia de neuronas o neuritas distróficas en las enfermedades neurodegenerativas de Alzheimer o

Creutzfeldt-Jakob), a los que se responsabiliza de la gliosis, pero en otros casos no se aprecian cambios celulares significativos que pueden ser origen del proceso (aunque habría que considerar la posible existencia de cambios moleculares que inducirían la astrogliosis local). Probablemente, cambios locales en factores neuronales o gliales pueden ser responsables de la respuesta glial aparentemente anómala (35) (Figura 1). También habría que señalar que neuronas de una capa que se hacen ectópicas en otra (bien de manera fisiológica o bien de manera patológica), se rodean de células gliales generalmente hipertróficas o bien se convierten en focos donde se orina hiperplasia astrogliar.

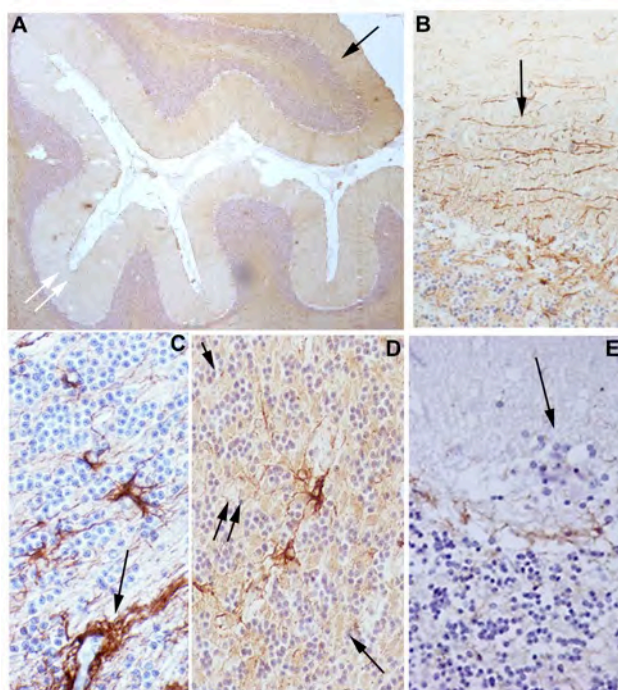


Figura 9. Astroglisis en cerebelo humano en la Enfermedad de Alzheimer. A. Imagen panorámica de un corte histológico donde se observan varias laminillas cerebelosas con diferente inmunoreactividad frente a PGFA en las fibras de Bergmann de la capa molecular (elevada –flecha negra- y muy débil –dos flechas blancas), pero con fuerte reactividad en los astrocitos de la sustancia blanca. B. Fibras de Veigert muy inmunorreactivas en una región de gran hipoactividad y/o involución de las fibras de Bergmann. C y D Astrocitos estrellados hipertróficos en la capa de los granos con reactividad elevada pero variable frente a anticuerpos PGFA en sus cuerpos y en los pies vasculares (flecha en C). La densidad de estos astrocitos en la capa de los granos nos hace suponer que existen otros con muy escasa reacción. Si comparamos las dos imágenes, observamos como en D existen grandes “espacios gliales”, débilmente reactivos, que son la imagen óptica de la hipertrofia de prolongaciones de astrocitos “velamentosos” de esta capa (flechas; dos flechas, núcleo astrocitario) y que no se observa en C. E. “Nicho” de células astrocitarias hiperplásicas (neoformadas) de reacción negativa situado en la capa molecular en contacto con la capa de Purkinje. A = x 10; B-E = x 180.

2.4. Cambios astrogliales regresivos: involución, atrofia, senescencia o astenia de la astroglia

En los últimos años, en las enfermedades neurodegenerativas (especialmente en la EA), se ha descrito que junto a la gliosis de muchos de los elementos astrocitarios, existen signos regresivos o involutivos de algunos otros, bien produciéndose una disminución del número total de astrocitos (hipoplasia astrocitaria), bien manteniéndose la densidad de estas células (25-28). Se han descrito diversos signos de atrofia de los procesos gliales, disminución de la inmunoreactividad ante anticuerpos contra GFAP y disminución de la expresión génica de enzimas específicas de los astrocitos relacionadas con el metabolismo del glutamato (36). Esta involución o regresión de los astrocitos ya fue descrita por Cajal y algunos de sus discípulos que consideraban que los astrocitos en la senilidad fisiológica y en ciertas situaciones patológicas (como enfermedades neurodegenerativas) tenían tendencia a la lisis (3,4, 6-8) (Figura 1). A este fenómeno lo denominaron “*klasmatodendrosis*” (27, 28), postulando que podría producirse bien por una verdadera involución o atrofia de algunos astrocitos normales (senescencia) o tras haberse “agotado” tras la astroglisis (astenia), o bien porque sufrieran algunos cambios que los hicieran sensibles al

procesamiento histológico (fijación o tinción) (Figura 1).

En muchos casos, de igual manera que se encuentran “nichos” o pequeñas/medianas áreas locales con alto grado de astroglisis con o sin hiperplasia, también se encuentran “nichos” o pequeñas/medianas áreas locales prácticamente carentes de células astrocitarias (Figura 8). Habría que estudiar más a fondo estas situaciones ya que han de tener una gran importancia en la patogenia de muchas enfermedades así como en su posible tratamiento cuando se pueda regular farmacológicamente el comportamiento de la astroglía.

Las consecuencias de esta involución astroglial parecen claras pues ante la consecuente desaparición de las respuestas gliales oportunas (de función plástica/adaptativa en el estado de reposo y neuroprotectora/neurorreparadora en la gliosis), se produce una falta de mantenimiento de las neuronas y sus conexiones que abocan a una degeneración neuronal. La aparición y curso de la atrofia o astenia astroglial es difícil de evaluar ya que los cambios observados en muchas situaciones patológicas pueden interpretarse de muy distinta manera. Puede considerarse como el origen: cambios homeostáticos gliotóxicos, neurotoxicidad o microgliotoxicidad contra los astrocitos, falta de respuesta astroglial adecuada ante una agresión al SN, degeneración celular como etapa final de la

astrogliosis neuroprotectora/neurorreparadora, etc. (30, 35).

3. RESPUESTAS DE LAS CÉLULAS DE LA OLIGODENDROGLÍA

Las respuestas de cada uno de los tipos de las células de la oligodendroglía (mielinizantes y no mielinizantes, ver monografía anterior (1)) no están bien estudiadas, especialmente la oligodendrogliosis. Sólo las respuestas de los subtipos de oligodendroglía que producen mielina, y precisamente por su capacidad de mielinizar fibras nerviosas, han merecido un estudio más pormenorizado. La desmielinización consecutiva a la hipoplasia y/o la involución o atrofia globalizada de la oligodendroglía (actualmente se visualiza muy bien la atrofia de la sustancia blanca con las modernas técnicas de neuroimagen) parece ser un fenómeno bastante característico de la senilidad fisiológica y de la patogenia de muchas enfermedades del SNC, mientras que la remielinización puede considerarse uno de los fenómenos más importantes en la protección contra la neurodegeneración (37). Íntimamente relacionada con la remielinización tenemos que considerar la gliosis reactiva de las células NG2⁺ (células gliales inmunorreactivas frente a anticuerpos contra la proteína común neuronal-glial tipo 2), denominadas también “progenitores adultos de oligodendrocitos” (1), que tiene una gran importancia en la regulación del curso patogénico ya que estas células pueden dar lugar tanto a estirpes oligodendrocitarias como astrocitarias y a neuronas (1, 38). La desmielinización origina enlentecimiento y alteraciones en la conducción de las señales nerviosas, lo que implica disfunción de los circuitos neuronales y tendencia a la neurodegeneración. La gliosis reactiva de las células NG2⁺ es un tema que se ha colocado en la primera línea de investigación por la posibilidad de que puedan utilizarse como fuente de neurogénesis reparativa espontánea o experimental (38, 39).

En la sustancia gris, en el envejecimiento y algunas situaciones tóxicas o degenerativas del SNC, se han descrito también cambios de los oligodendrocitos no mielinizantes aunque su significado es todavía impreciso. Así mismo se ha constatado que estas situaciones patológicas se pueden presentar variaciones muy marcadas en las zonas en donde comienzan a mielinizarse los axones que van a emerger a la sustancia blanca así como una

mielinización aberrante focal dentro de la misma sustancia gris.

4. RESPUESTAS DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

4.1. Microgliosis: respuesta de las células microgliales residentes y reclutamiento de nuevas células microgliales

La familia microglial responde de manera muy rápida y con efectos muy marcados en el SN. Los cambios plásticos adaptativos hacen que estos elementos gliales “residentes” (los “vigilantes del sistema inmunitario innato”) tengan un papel primordial en el mantenimiento y plasticidad de las neuronas y en la “vigilancia y control” de muchos factores del medio interno (1, 41, 42). En el envejecimiento y cuando se producen alteraciones patológicas, estas células residentes sufren cambios morfológicos y bioquímicos profundos y son acompañados de hiperplasia de algunos elementos (“microgliosis de los elementos residentes”) (20, 21, 42) (Figura 10). Esta microgliosis origina un proceso conocido como “neuroinflamación” o “respuesta neuroinflamatoria” que tiene una gran repercusión sobre el tejido nervioso, y que aunque parece tener un significado primario de neuroprotección, puede a posteriori ser neurotóxico (42-45) (Figura 11). En el proceso se integra, además, con otro importante fenómeno, el reclutamiento de nuevos elementos microgliales a partir de células procedentes de la médula ósea y que circulan por el torrente sanguíneo (42-45). El proceso neuroinflamatorio se acelera por influjo de nuevas sustancias astrogliales que ayudan a que muchos macrófagos se permeabilicen desde los espacios perivascuales y subpiales (espacios de Virchow-Robin) hasta introducirse en el parénquima nervioso donde se transforman en células de microglía activas (46-48) (Figura 10). Estos nuevos elementos microgliales reclutados presentan, en principio, una diferente tipología pero se llegan a hacer morfológicamente indistinguibles (pues dan lugar tanto a células con prolongaciones como redondeadas sin prolongaciones). Sin embargo, existen subconjuntos que expresan algunos genes de manera específica, por lo que pueden ser diferenciados algunos subtipos de microglía y que son la base empleada para definir distintas líneas o formas de respuesta microglial (o de respuesta neuroinflamatoria) (46-48).

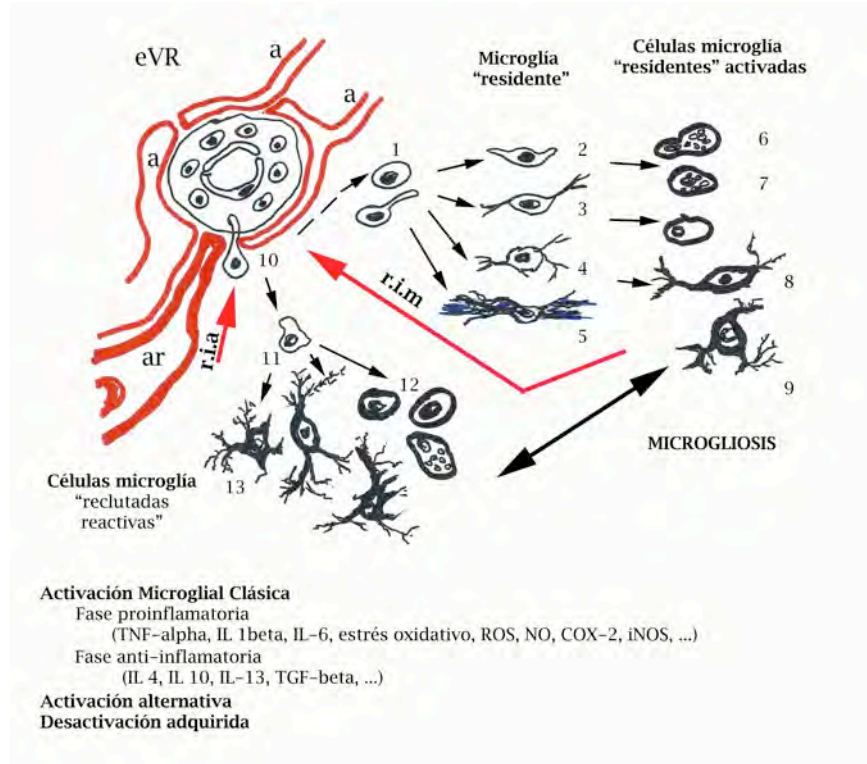


Figura 10. Microgliosis. Esquema donde se representa la formación de células de microglía activadas. Por una parte, diferentes subtipos de células “residentes” de microglía, con pocas o muchas prolongaciones (2-4), parenquimatosas o perivascuales (5), que provienen de la diferenciación en diversas estirpes morfofuncionales de las células morfológicas invasoras del SNC durante el desarrollo embriológico [1], se activan produciendo diferentes subtipos de células “residentes” reactivas con diversidad de formas y prolongaciones (6-7), con diferentes capacidades funcionales y que expresan diferentes genes (6-9). Esta primera oleada de células microgliales “neuroinflamatorias” provocan una reacción inflamatoria (r.i.m) que junto a la reacción inflamatoria astrogliar (r.i.a) facilita el ingreso al parénquima nervioso de células macrofágicas (10) desde los espacios perivascuales de Virchow-Robin (eVR). Estas células se convierten en células de microglía “reclutadas” (11) que se activan configurando diversas estirpes de células reactivas de diferente morfología (redondeada y con prolongaciones) (12, 13) que se suman a las “residentes” produciendo diverso cuadros de microgliosis en distintos tipos y fases de las reacciones neuroinflamatorias.

4.2. Líneas o formas de respuesta microglial

En los últimos años se han ido perfilando diversas líneas, formas o procesos de respuesta microglial, íntimamente relacionados con respuestas pro- y anti-inflamatorias (Figura 11). Río-Hortega describió la activación de la microglía como un fenómeno relacionado con la fagocitosis de los restos celulares (neuronales en su mayoría) tras la destrucción del tejido nervioso ante una agresión o tras un proceso degenerativo (43). Consideró como signos de la activación de las células residentes la pérdida de prolongaciones y la transformación en células redondeadas. Pero actualmente se considera que existen diferentes líneas de “activación” o “respuesta” de la microglía y diferentes subtipos o subconjuntos de células microgliales que expresan distintas sustancias pro-inflamatorias y anti-inflamatorias que, en última instancia, producen importantes cambios en la estructura y función de las neuronas y sus circuitos y en las células gliales acompañantes, estando implicadas en diversos fenómenos de neuroprotección, neuroreparación y/o neurodegeneración (49). En este sentido se ha descrito una amplia gama de citoquinas y quimioquinas (y de sus

receptores) que son producidas por los diversos subtipos, variedades o subconjuntos de células microglióticas, residentes y reclutadas, así como de receptores que promueven la fagocitosis de sustancias y productos de desecho celular (44-46).

Entre las distintas formas o líneas de respuesta microglial se ha descrito (Figura 11):

- la “activación microglial clásica” que consta de varias fases: Su primera fase, “fase pro-inflamatoria”, es lo que se puede considerar la respuesta inmune innata específica del tejido nervioso (1) y que en principio protege contra patógenos y restos tóxicos derivados de la necrosis neuronal. Está asociada a la producción y liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias como el TNF α (factor de necrosis tumoral α), IL-1 β , IL-6 (interleuquinas 1 y 6) (23, 49) y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Esta fase estaría dedicada a eliminar neurotoxinas pero las sustancias producidas podrían tener un efecto neurotóxico importante que diera lugar a neurodegeneración (49, 50). Esta fase inicial es seguida por otra fase, “fase anti-inflamatoria”, que se asocia a la producción y liberación de citoquinas y quimioquinas anti-inflamatorias como TGF β (factor de transformación del

crecimiento tumoral), IL-4, IL-10, IL-13 (interleuquinas 4, 10 y 13) (23, 51-56), que tienden a detener la progresión de la primera fase, en primer lugar, y luego a reparar el tejido dañado en aquella fase. En estas dos fases existe una cooperación de los astrocitos activados y de células T sanguíneas (56).

- La denominada “activación alternativa de la

microglía” y la “desactivación adquirida” (51-54) son formas de respuesta que presentan activación de otros conjuntos de genes distintos a los observados en la activación clásica, que pueden cursar en fases (todavía no bien diferenciadas) y que parecen promover la reparación del tejido.

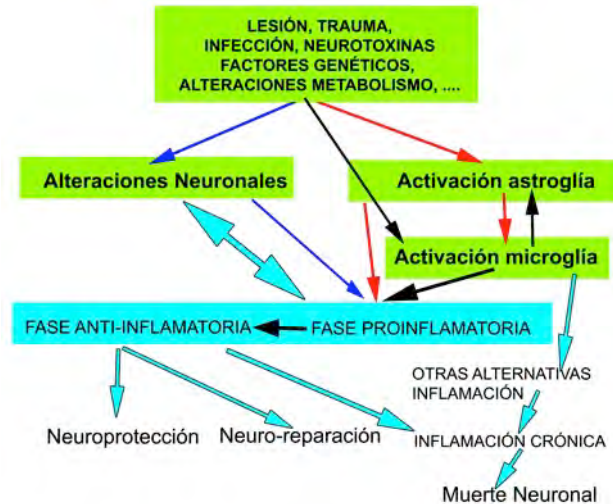


Figura 11. Neuroinflamación. La “neuroinflamación” es un proceso (o conjunto de procesos) específico del SN basado en la microgliosis (recuérdese que la microglía representa el componente celular del sistema inmune innato del SN [1]) con la colaboración de la astrogliosis y en estrecha relación (causa y efecto) de las alteraciones neuronales. En este muy simplificado esquema se muestra como diversas causas externas o internas al organismo y/o el cerebro y (lesiones, traumas, infecciones, alteraciones genéticas o del metabolismo, envejecimiento etc.) provocan activación de la microglía (en especial) y de la astrogliá e inducen alteraciones neuronales. Las sustancias pro-inflamatorias originadas inician los procesos neuroinflamatorios que dan lugar a cambios en el tejido que, en principio, tienden a reparar las lesiones neuronales. En la “vía (o proceso) neuroinflamatoria clásica”, la más frecuente ante agresiones agudas, existe una fase “pro-inflamatoria” que activa mecanismos de defensa y una fase antiinflamatoria en donde se protegen las neuronas o se reparan sus daños. Si fracasa esta neuroprotección/neurorreparación; si se produce una inflamación crónica (envejecimiento, enfermedad neurodegenerativa) o si se activan vías alternativas neuroinflamatorias, se puede aumentar la agresión neuronal e inducir la muerte de las neuronas.

La expresión de algunos genes son utilizados en algunos trabajos para calificar las distintas poblaciones de células en microgliosis. En los procesos agudos del SN, como traumas cerebrales, se observa una respuesta clásica con una buena definición de sus fases, pero en los procesos crónicos, especialmente los neurodegenerativos, se aprecian conjuntamente diferentes estados de activación dentro de las distintas fases de las posibles líneas de respuesta microglial, pues existen simultáneamente elementos microgliales supuestamente característicos de distintas fases de respuestas inflamatorias (30, 49). Tanto los estudios neuropatológicos/morfohistoquímicos, que han mostrado una gran variedad de cuadros de infiltración de células de microglía en el tejido, como los bioquímicos, que muestran la existencia de una gran variedad de moléculas pro- y anti-inflamatorias, hacen muchas veces muy difícil la interpretación del papel de la microglía en estos procesos patológicos crónicos. Por ejemplo, aunque todos los autores coinciden en la importante implicación de la microglía y de la neuroinflamación en la patogenia de la EA, existe una gran controversia entre los autores sobre las ubicaciones y las funciones que se asigna a la microglía en las distintas “cascadas patogénicas” descritas para

explicar la génesis y el curso clínico de la enfermedad (30).

En los estudios anatomopatológicos, en algunos casos se puede observar la coexistencia de las dos variedades básicas morfológicas (células con o sin prolongaciones) empleando una misma reacción histoquímica, mientras que en otros existe un predominio de una o de otra morfología (bien de manera generalizada o bien con predominio específico de algún tipo en alguna de las regiones del SNC) (Figura 12). Quizá el ejemplo más típico de esta diversidad la podemos encontrar en las enfermedades priónicas. En el cerebelo de las ovejas con scrapie o en el Creutzfeldt-Jakob humano se pueden observar diferencias de infiltración microglial en las capas (molecular, de Purkinje, de los granos y sustancia blanca) así como presentación de casos con predominio de uno u otro tipo morfológico (Figura 12) (30). Este hecho no ha sido todavía ni bien estudiado ni bien explicado, y podría responder bien a la existencia de distintos tipos de respuesta neuro-microglial, bien a diferentes fases en la evolución de un proceso patológico y/o bien a distintas sub-patologías dentro de un mismo proceso clínico (con manifestaciones clínicas similares).

Los diferentes tipos de reacción microglial pueden tener diversos significados neuroprotectores o neurotóxicos para las neuronas del entorno y son la base del proceso neuroinflamatorio. El proceso neuroinflamatorio es un componente determinante del curso de la patogenia de las enfermedades del cerebro pues condicionará la supervivencia o no de las neuronas. La supervivencia de las funciones superiores cerebrales

(pensamiento, aprendizaje, memoria, ...) en enfermedades neurodegenerativas y tóxicas estará condicionada por la neuroprotección y la neurorreparación del tejido nervioso en áreas clave del cerebro basadas en las respuestas astrogliales y microgliales asociadas a la neuroinflamación, que también incluye destrucción de neuronas dañadas y eliminación de sus restos (30, 44-49).

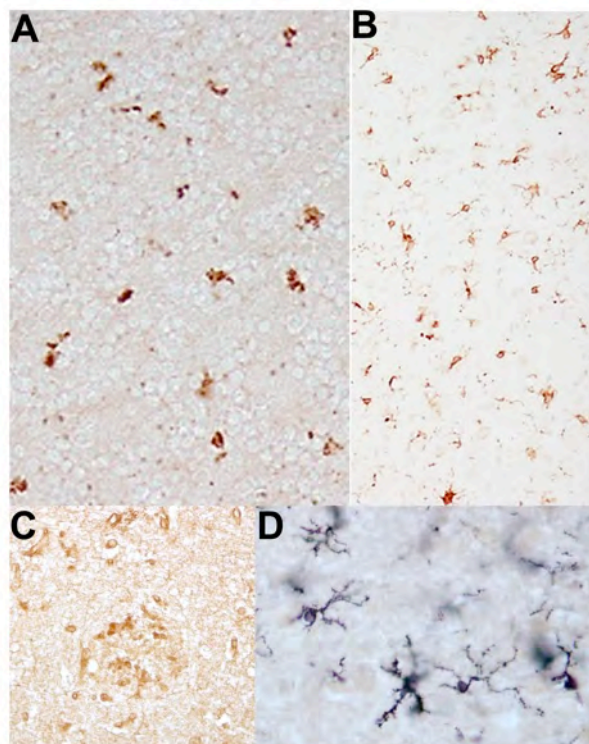


Figura 12. Microgliosis en la enfermedad de Alzheimer. A Microgliosis en la capa de los granos del cerebelo. Formas redondeadas, especialmente fagocitarias inmunoteñidas con CD-68. B. Intensa microgliosis de formas variadas con prolongaciones en la corteza cerebral prefrontal inmunoteñida con anticuerpos contra la proteína Iba-1. C Intensa microgliosis de formas esencialmente sin prolongaciones en la corteza cerebral prefrontal en estrecha relación con placas amiloides, inmunoteñida con anticuerpos contra lectina de tomate. D. Células de microglía muy hipertróficas y con grandes prolongaciones en hipocampo. A, C, D= x180; B = x 60.

5. CONCLUSIONES

Todos los miembros de las familias de la neuroglía tienen la capacidad de adoptar un estado reactivo (“gliosis” de manera general; “astrogliosis”, “oligodendroglisis” y “microgliosis”, en su forma más específica) que las convierte en “nuevas células con nuevas funciones”, actores principales en el escenario donde se representan los dramas de las situaciones patológicas del SN. Las respuestas gliales son fundamentales en la resolución de muchas alteraciones del SN y también son causa de la presentación y progresión de muchas patologías.

Los estudios sobre estos diferentes tipos de células activas han ampliado en una importante manera los conocimientos que teníamos sobre la patogenia de las enfermedades del SN, pero también nos están dando a conocer que pueden ser importantes apoyos para definir dianas farmacológicas terapéuticas o crear nuevas terapias celulares que ayuden a controlar el avance de las “cascadas patogénicas” por la vía de activar la neuroprotección-

neurorreparación e inhibir la neurotoxicidad-neurodegeneración (1, 57-59).

El gran reto reside en definir qué genes astrogliales o microgliales deben activarse o que subtipo de células gliales activadas deben ser utilizadas en las terapias celulares para proteger y ayudar al mantenimiento de las neuronas (o los circuitos neuronales) o a que éstas no degeneren. También, en este sentido, es de suma importancia definir dianas celulares en las células gliales que pueden activar en estas células su capacidad para prevenir la neurodegeneración, tal como se ha descrito que pudiera llevarse a cabo regulando los receptores para glutamato sensibles al calcio que existen en los astrocitos y que pueden normalizar la neurotransmisión glutamatérgica neuronal por su implicación directa de la astroglia en la neurotransmisión neuro-neuronal (57-59).

En el envejecimiento fisiológico del cerebro, en el envejecimiento patológico/EA (la gran “epidemia” del siglo XX – y del XXI) y en todas las afecciones neurodegenerativas distintas a la EA pero que cursan con

demencia (como el Parkinson, la demencia frontoparietal, las enfermedades priónicas, etc.) existen profundos cambios gliales. Generalmente, los cambios observados son interpretados de manera negativa, sin una base cierta en muchos trabajos. Así mismo, muchos de los cambios neurotóxicos apreciados en ciertos centros del SNC son directamente extrapolados a todo el cerebro sin analizar su papel real en cada región del mismo. Se considera apriorística y erróneamente que cualquier tipo de gliosis observado es un factor desencadenante o acelerador del proceso neurodegenerativo. Sin embargo, existe una base científica cierta para pensar que no es tan importante la gliosis en algunos casos o que puede tener una significación neuroprotectora en otros (30, 41, 56). El mayor problema en estas situaciones involutivas del cerebro es diferenciar qué modificaciones gliales son beneficiosas y que modificaciones son perjudiciales para el cerebro. Se necesitan investigaciones más profundas, llevadas a cabo sobre cerebros humanos y cerebros de modelos experimentales, de manera comparativa morfológica, histoquímica y bioquímica, para obtener conclusiones definitivas sobre la implicación de la reactividad de cada tipo y subtipo glial y definir dianas terapéuticas gliales específicas que proporcionen la neuroprotección y eviten o disminuyan la toxicidad glial.

En esta revisión se ha tratado de presentar los distintos tipos de reacciones gliales y su posible papel en la patogenia de las enfermedades del SNC para que se reflexione sobre su posible el verdadero papel de la glía en la patogenia, diagnóstico y tratamiento (preventivo o paliativo). Los resultados obtenidos en estudios en humanos que padecieron diversas enfermedades del SNC y en modelos animales de las mismas, sugieren que los cambios reactivos en las distintas familias gliales son tanto responsables de distintos procesos patológicos (que deben ser combatidos) como de la existencia de fenómenos neuroprotectores/reparadores que los combaten (y que deben ser estimulados).

6. REFERENCIAS

1. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A. Nuevos conceptos sobre la funcionalidad del sistema nervioso: la revolución de las células gliales. I. Las relaciones neuro-gliales. *An Real Acad Farm* 2015; 81:11-8.
2. Virchow R. *Die Cellular pathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Berlín: Verlag 1858.
3. Ramón y Cajal S. Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol* 1913; 11: 255-315.
4. Ramón y Cajal S. Contribution á la connaissance de la névroglie cérébrale et cérébelleuse dans la paralysie générale progressive. *Trav. Lab Recher Biol Univ Madrid* 1925; 23: 157-216.
5. Del Río Horteiga P. El "tercer elemento" de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol Soc Esp Biol* 1919; 8:68-82.
6. Ramón y Cajal, S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. New York: Harper Press 1969.
7. Achúcarro N, Gayarre M. Contribución al estudio de la neuroglia en la corteza de la demencia senil y su participación en la alteración celular de Alzheimer. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 1914; 12: 68-83.
8. Achúcarro N, Gayarre M. La corteza cerebral en la demencia paralítica con el nuevo método del oro y sublimado de Cajal. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 1914; 12: 1-38.
9. Penfield W. Neuroglia: normal and pathological, In: *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. (Ed: Penfield W) Vol II. New York: PB Hoeber Inc. 1932: pp 423-79.
10. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 2014; 94: 1077-98.
11. Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012; 34:881-95.
12. Mitew S, Kirkcaldie MT, Dickson TC, Vickers JC. Altered synapses and gliotransmission in Alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiol Aging* 2013; 34:2341-51.
13. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging* 2014; 35:15-23.
14. Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M, Hol EM. GFAP and vimentin efficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia* 2015; 63:1036-56.
15. Whitaker-Azmitia PM, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* 1997; 776:51-60.
16. Zimmer C, Sampaolo S, Sharma HS, Cervós-Navarro J. Altered glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat brain following chronic hypoxia. *Neuroscience*. 1991; 40:353-61.
17. Berciano MT, Andres MA, Calle E, Lafarga M. Age-induced hypertrophy of astrocytes in rat supraoptic nucleus: a cytological, morphometric, and immunocytochemical study. *Anat Rec* 1995; 243:129-44.
18. Herx LM, Yong VW. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:961-71.
19. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993; 54:15-36.

20. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2:a006346.
21. Meraz-Ríos MA, Toral-Ríos D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci* 2013; 13 7:59. doi:10.3389/fnint.2013.00059.
22. Town T, Nikolic V, Tan J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation*, 2005; 2:24, doi:10.1186/1742-2094-2-24.
23. Colton CA. Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *J. Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4:399-418.
24. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39:3-18.
25. Verkhratsky A, Marutle A, Rodríguez-Arellano JJ, Nordberg A. Glial Asthenia and functional Paralysis: A new perspective on neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Neuroscientist* 2014; 14. pii: 1073858414547132.
26. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AH, Kooijman L, Bossers K, Hol EM. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 2746-60.
27. Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 2009; 16:378-85.
28. Verkhratsky A, Rodríguez JJ, Parpura V. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol* 2013; 8: 149-58.
29. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Olie SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012; 121:4-27.
30. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A, Merino JJ, Rodríguez-Arellano JJ. Brain Local and regional neuroglial alterations in Alzheimer's Disease: Cell types, responses and implications. *Curr Alzh Res* 2016; 16 (en prensa).
31. Papa M, De Luca C, Petta F, Alberghina L, Cirillo G. Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 42: 35-54.
32. Monzón-Mayor M, Alvarez M, Arbelo-Galván J, Romero-Alemán M, Yanes C, et al. Long-term evolution of local, proximal and remote astrocyte responses after diverse nucleus basalis lesioning (an experimental Alzheimer model): GFAP immunocytochemical study. *Brain Res* 2000; 865:245-58.
33. Hailer NP, Grampp A, Nitsch R. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 1999; 11:3359-64.
34. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A. Diversity and variability of the nicotine effects on different brain cortical regions. Therapeutic and toxicologic implications. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 2010; 10:180-206.
35. Alvarez MI, Rivas L, Lacruz C, Toledano A. Astroglial cell subtypes in the cerebella of normal adults, elderly adults, and patients with Alzheimer's disease: A histological and immunohistochemical comparison. *Glia* 2015; 62:287-312.
36. Kulijewicz-Nawrot M, Syková E, Chvátal A, Verkhratsky A, Rodríguez JJ. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro* 2013; 5:273-82.
37. Franklin RJ, Goldman SA. Glia Disease and Repair-Remyelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* May 2015; 18;7:a020594. doi: 10.1101/cshperspect.a020594.
38. Vanzuli I, Rivera A, Arellano JJ, Butt A. Decreased regenerative capacity of oligodendrocyte progenitor cells (NG2-glia) in the ageing brain: a vicious cycle of synaptic dysfunction, myelin loss and neuronal disruption? *Curr Alzheimer Res* 2016; (en prensa).
39. Crawford AH, Stockley JH, Tripathi RB, Richardson WD, Franklin RJ. Oligodendrocyte progenitors: adult stem cells of the central nervous system? *Exp Neurol* 2014; 260:50-5.
40. Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* 2013; 81: 1079-88.
41. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 2011; 31:16064-9.
42. Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B. Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiol Learn Mem* 2013; 105: 40-53.
43. Del Río-Hortega P. Microglía. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, Vol. II.* (Ed: Penfield W). New York: Hafner 1932: pp. 483-534.
44. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Front Cell Neurosci.* 2015; Dec 17;9:476. doi: 10.3389/fncel.2015.00476. eCollection.
45. Sandu RE, Buga AM, Uzoni A, Petcu EB, Popa-Wagner A. Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology. *Neural Regen Res* 2015; Sep;10(9):1349-55. doi: 10.4103/1673-5374.165208.
46. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2011; 14:1227-35.
47. Li T, Pang S, Yu Y, Wu X, Guo J, Zhang S.

- Proliferation of parenchymal microglia is the main source of microgliosis after ischaemic stroke. *Brain* 2013; 136:3578-88.
48. Nimmerjahn A.; Kirchhoff, F.; Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308:1314-8.
 49. Colton C, Wilcock DM. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9: 174-91.
 50. Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2001; 22:873-83.
 51. Han, J.; Ulevitch, R.J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat. Immunol* 2005; 6, 1198-1205.
 52. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73:209-12.
 53. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:23-35.
 54. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13: 453-61.
 55. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-64.
 56. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 2007; 147: 867-83.
 57. Chiarini A, Dal Pra I, Menapace L, Pacchiana R, Whitfield JF, Armato U. Soluble amyloid beta-peptide and myelin basic protein strongly stimulate, alone and in synergism with combined proinflammatory cytokines, the expression of functional nitric oxide synthase-2 in normal adult human astrocytes. *Int J Mol Med* 2008;16:801-7.
 58. Chiarini A, Gardenal E, Whitfield JF, Chakravarthy B, Armato U, Dal Pra I. Preventing the spread of Alzheimer's disease neuropathology: a role for calcilytics? *Curr Pharm Biotechnol* 2015; 16:696-706.
 59. Chiarini A, Dal Pra I, Marconi M, Chakravarthy B, Whitfield JF, Armato U. Calcium-sensing receptor (CaSR) in human brain's pathophysiology: roles in late-onset Alzheimer's disease (LOAD). *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10:317-26.
 60. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A. Envejecimiento cerebral normal y patológico: continuum fisiopatológico o dualidad de procesos involutivos. *An Real Acad Farm* 2014; 80:500-39.



Are meat and meat product consumptions harmful? Their relationship with the risk of colorectal cancer and other degenerative diseases

Title in Spanish: *¿Es el consumo de carne y derivados peligroso para la salud? Relación con el riesgo de cáncer colorrectal y otras enfermedades degenerativas*

Paloma Celada¹ y Francisco J. Sánchez-Muniz^{1,*}

¹Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia. Plaza Ramón y Cajal s/n. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid

ABSTRACT: The excessive intake of meat and meat products has been related with increased morbimortality incidence of chronic diseases, particularly with cardiovascular diseases and various types of cancer. Very recently the WHO has published a preliminary inform associating meat products consumption with colorectal cancer, suggesting that this association is based in the presence of different compounds (e.g. nitrites, nitrates) that are normally present in those foods, especially in modified meat products that are suggested to culinary procedures. Nonetheless, although risk and alarm exist, several items pointed out in this inform has, to the best of our knowledge, limitations that we will try to indicate and review, particularly those derived from observational studies where the cause-effect relationship found did not fit the criteria demanded By Hill for Epidemiological studies. Thus, present review discusses in the frame of the meat and meat products the following items: 1) definition; 2) consumption in Spain; 3) nutritional importance; 4) consumption health risks; 5) potential toxic products in meat products, the WHO inform; 6) other dietary compounds and their palliative role in the meat-pathology relationship; 7; the role and importance of the media in the news; 8) conclusions and future remarks.

RESUMEN: El consumo excesivo de carne y derivados ha sido relacionado con una incidencia incrementada de morbi-mortalidad por enfermedades degenerativas, particularmente con las enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer. Muy recientemente la OMS ha emitido un informe preliminar asociando consumo de carne y cáncer de colon, atribuyendo dicha relación a la presencia de diferentes tipos de compuestos (p.e. aminas aromáticas, nitritos, nitratos) presentes en este grupo de alimentos, especialmente en los cárnicos modificados y que pueden originarse por la manipulación culinaria. No obstante, y aunque la alarma y el riesgo existen, muchos aspectos señalados en ese informe tienen a nuestro entender limitaciones que pretendemos señalar y revisar, particularmente aquellas derivadas de estudios observacionales, donde la relación causa-efecto encontrada no cumple los criterios demandados por Hill para estudios epidemiológicos. Por ello la revisión analiza en el contexto de carne y productos cárnicos los siguientes apartados: 1) definición; 2) consumo en España; 3) importancia nutricional; 4) riesgos para la salud; 5) compuestos potencialmente tóxicos en carne y derivados, el informe de la OMS; 6) otros componentes de la dieta y su papel paliativo en la relación carne-patología; 7) el poder y la importancia de los medios en la comunicación de noticias; 8) conclusiones, pautas y actuaciones futuras.

*Corresponding Author: frasan@ucm.es

Received: Mars 9, 2016 Accepted: April 15, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 1 (2016), pp. 68-90

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos han jugado siempre un papel importante en los hábitos alimentarios del hombre. Este papel no se limita exclusivamente al ámbito nutricional sino también al social y cultural. Aunque en algunos grupos sociales su consumo está limitado por creencias religiosas o cuestiones éticas, en general la carne es un alimento de prestigio, apreciado y asociado a una buena salud y prosperidad.

El consumo de carne es muy elevado en todo el mundo (1), pero las diferencias entre los países desarrollados y los

que están en vías de desarrollo dan idea de la importancia que tiene el factor económico, y por tanto social, en el patrón de consumo de este alimento. De manera didáctica el consumo de carne sirve para clasificar a un país desarrollado o en vías de desarrollo: cuando mayor es el poder adquisitivo, y por tanto mayor el nivel social y de desarrollo, el consumo de carne se eleva. Estas cantidades de consumo van ligadas a un volumen de dinero también elevado lo que convierte a la carne en uno de los alimentos más importantes desde un punto de vista socio-económico.

Hay que considerar además que su ingesta supone un aporte muy importante de nutrientes (proteínas, grasa,

Are meat and meat product consumptions harmful? ...

hierro, cinc, vitamina B₁₂, etc.) que explica que en la población de algunos países en vías de desarrollo, donde su ingesta es menor, se observen carencias nutricionales. La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en un informe de 2011 (1) recomendó el consumo de este grupo de alimentos como garantía de aporte de los nutrientes anteriormente citados para poblaciones en riesgo (infectados por VIH, niños y mujeres).

1.1. Definición

Según el Código Alimentario Español (CAE) (2), se entiende por carne la parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos, sanos, sacrificados en condiciones higiénicas; tras el sacrificio del animal el tejido muscular después de una serie de procesos se transforma en carne. Por extensión, se aplica también a los animales de corral, cazas de pelo y pluma y mamíferos marinos. Dentro del apartado de carnes se han de considerar los despojos que, según el CAE, son las partes comestibles que se extraen de los animales y que no están comprendidas dentro del término canal.

Los derivados cárnicos son productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o despojos de las especies autorizadas en el CAE. La mezcla de estos ingredientes, elaborados mediante salazón, deshidratación, cocción o su combinación, da lugar a la aparición de nuevos productos que se clasifican en: salazones, ahumados y adobados; tocinos; embutidos, charcutería y fiambres; extractos y caldos de carne; tripas (3).

Entendemos por carne procesada cualquier tipo de carne que ha sido transformada con salazón, curado,

fermentación, ahumado u otros procesos para mejorar el sabor y preservar el alimento (3, 4).

No debemos olvidar que en la actualidad existen multitud de derivados y procesados cárnicos en los que además de los compuestos e ingredientes habituales (carne, grasa, sal, estabilizantes), de uso obligado para conseguir un producto agradable, palatable, seguro y nutritivo, se incorporan en su matriz compuestos e ingredientes que buscan dar al producto final un valor añadido, en línea de lo que entendemos debe aportar un alimento para ser funcional (5).

En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de productos cárnicos diseñados en el subproyecto FUNCIOCA (6) perteneciente a las actividades de CARNISENUSA para la génesis de productos cárnicos para el siglo XXI susceptibles de incluir declaraciones nutricionales de acuerdo con el Reglamento de la Comunidad Europea 1924/2006 (7) en los que se han utilizado diferentes componentes de interés nutricional, haciendo especial mención del tipo de producto cárnico diseñado, del ingrediente añadido y tipo de declaración nutricional que generan, así como de la referencia bibliográfica correspondiente. A este respecto, señalar que nuestro grupo de investigación lleva más de quince años diseñando y comprobando propiedades funcionales de derivados cárnicos a los que se modificó su composición mediante la incorporación de pasta de nuez (16), algas (17), glucomanano (18) y ácidos grasos oleico y de la familia omega-3 (19).

Tabla 1. Ejemplos de productos cárnicos desarrollados en el marco del subproyecto FUNCIOCA*

	<i>Declaraciones</i>	<i>Referencia</i>
Productos frescos		
Hamburguesas: Adición de licopeno (máx 7,9 mg/100 g)	Contiene licopeno	Selgas y col. (8)
Producto tipo hamburguesa con algas (Wakame)	Fuente de magnesio y potasio	López-López y col. (9)
Productos cocidos		
Salchichas tipo frankfurt: Mezcla de aceites preemulsificada (oliva+lino+pescado) como sustituto de tocino (100%)	Alto contenido omega-3, AGM y AGI Alto contenido proteínas	Delgado-Pando y col. (10)
Paté: Gel de konjac con mezcla de aceites (oliva+lino+pescado) como sustituto de tocino (100%)	Valor energético reducido Alto contenido proteínas Alto contenido omega-3, AGM y AGI	Delgado-Pando y col. (11)
Productos crudos curados		
Chorizo: Aceite de lino preemulsificado como sustituto de tocino (25%) y con antioxidantes (<i>Borago officinalis</i>)	Alto contenido omega-3 Alto contenido proteínas	García Iñiguez de Ciriano y col. (12)
Chorizo: Gel de konjac con mezcla de aceites (oliva+lino+pescado) como sustituto de tocino (25-100%)	Valor energético reducido Alto contenido proteínas Alto contenido omega-3, AGM y AGI	Jiménez-Colmenero y col. (13)
Salchichón: Adición de Ca (máx. 300 mg/100 g) en forma de citrato, gluconato y lactato cálcico	Fuente de calcio Contenido reducido de grasa	Selgas y col. (14)
Salchichón con fructooligosacáridos, FOS (máx. 6%)	Fuente de fibra	Salazar y col. (15)
Reducción de grasa (58%)	Contenido reducido de grasa	

Adaptado de Jiménez Colmenero y col. (6). *FUNCIOCA, subproyecto al amparo de CARNISENUSA para la génesis de productos cárnicos para el siglo XXI susceptibles de incluir declaraciones nutricionales de acuerdo con el Reglamento 1924/2006 (7).

2. CONSUMO EN ESPAÑA

El consumo de carne y derivados es muy elevado en todo el mundo, pero particularmente en España (20). En la Figura 1 se puede observar que de los 140 g/día de carne, que se ingieren en los hogares españoles, algo más del 23% corresponde a carne procesada (20). Dentro del grupo “carne fresca” es de resaltar el consumo en nuestro país

fundamentalmente de las carnes de bovino y porcino seguido de lejos por las de ovino, caprino y aviar. Es de resaltar que a pesar de las posibles diferencias existentes entre comunidades atribuibles a hábitos alimentarios, las cantidades y proporciones de los diferentes tipos de corte no son muy dispares (Figura 2).

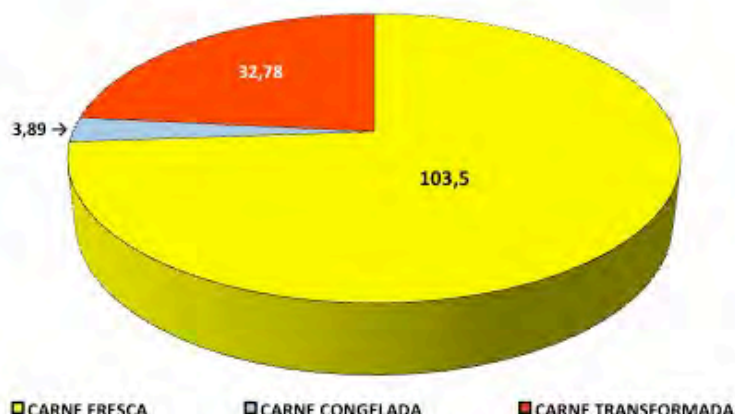


Figura 1. Consumo de carne en los hogares españoles (g/día). A estas cantidades habría que sumar un 10% adicional debido al consumo fuera del hogar. Se detalla el consumo de carne fresca, congelada y transformada. Fuente: Informe Mercasa (20).

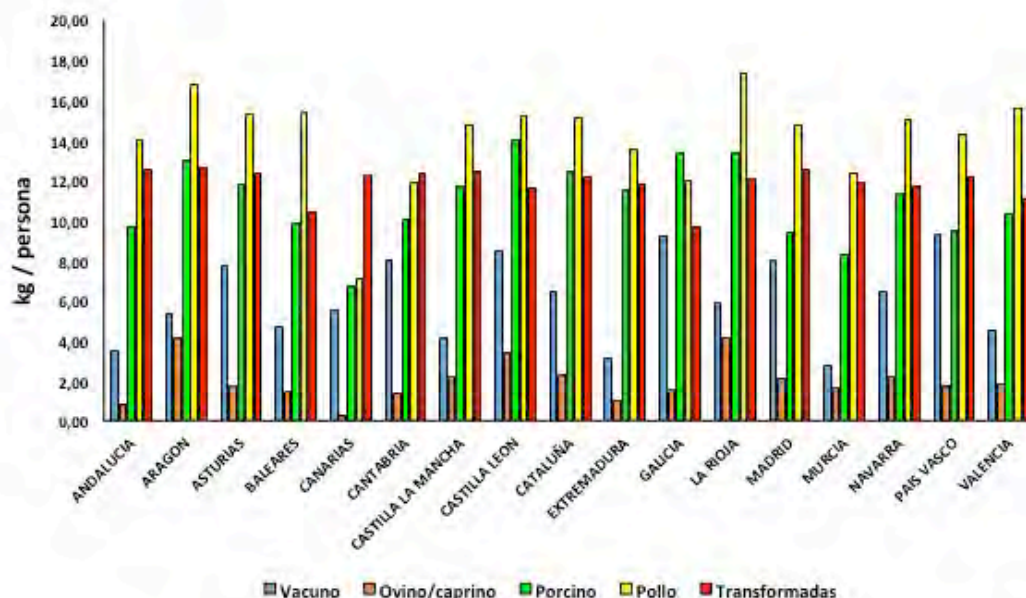


Figura 2. Consumo medio (kg/persona/año) de diferentes tipos de carne en las diferentes Comunidades Autónomas. Fuente: Informe Mercasa (20).

En todas las Comunidades Autónomas prevaleció el consumo de pollo excepto en Canarias, Cantabria y Galicia. Tampoco el consumo ha sido constante en nuestro país, ya que las diferentes crisis alimentarias (vacas locas, gripe aviar, etc.) han modificado de forma evidente, aunque sólo por cortos períodos de tiempo, tales cambios.

En la Figura 3 se muestra un detalle de la evolución del consumo total, así se observa que los cambios fueron vertiginosos desde 1964 a 1981, elevándose el consumo en más de dos veces, fruto de los cambios que tuvieron lugar en España, fundamentalmente debidos a disponibilidad económica e influencias foráneas. También se detectan

descensos y recuperaciones rápidas, existiendo una tendencia actualmente al descenso, posiblemente mediada por el precio de la carne y la crisis económica; no obstante, por el objetivo de esta revisión no se incidirá más en este aspecto.

La carne procesada a su vez está repartida en diferentes

productos y en las cantidades reflejadas en la Figura 4. Entre los productos es de resaltar el consumo diario de fiambres (alrededor de 7g/cabeza/día seguido por el de jamón cocido, jamón curado normal y salchichas (alrededor de 4g/cabeza y día).



Figura 3. Evolución del consumo de carne en España a lo largo de las últimas décadas. Adaptado de Informe Mercasa (20) y Jiménez-Colmenero y col. (21).

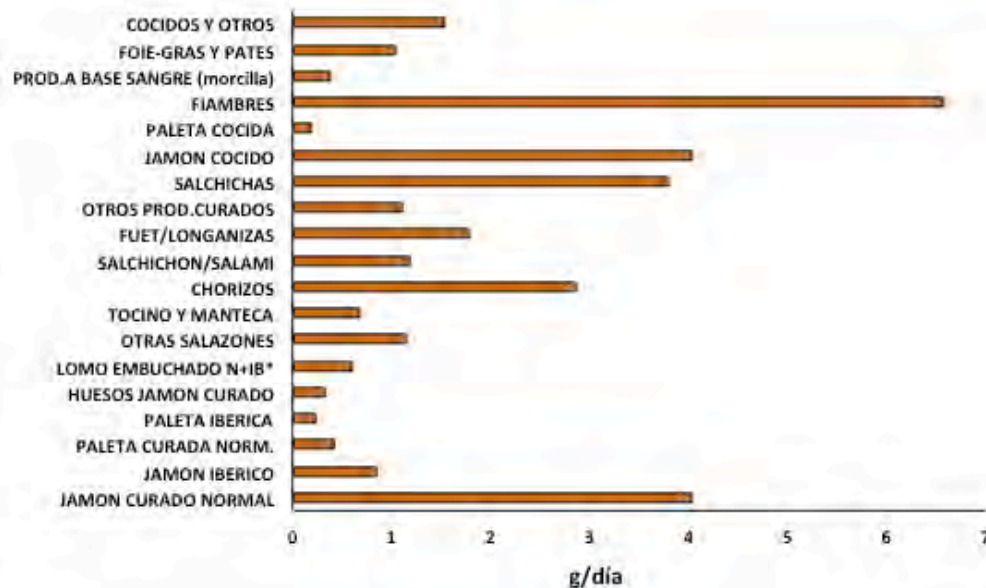


Figura 4. Consumo de carne procesada y diferentes tipos en los hogares españoles. Fuente: Informe Mercasa (20).

3. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LA CARNE Y DERIVADOS

Los principales componentes de la carne son agua (60-80%), proteínas (16-25%) (un 40%, aproximadamente, de sus aminoácidos son esenciales) y grasa (1-30%). El contenido de hidratos de carbono es bajísimo ya que el existente en el músculo en forma de glucógeno, desaparece casi en su totalidad durante el proceso de maduración.

Sin embargo, estas proporciones varían dependiendo del animal, edad, sexo, alimentación y zona anatómica analizada (22). En cantidades pequeñas se aprecian sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, creatina, nucleótidos, etc.), hidratos de carbono, ácido láctico, vitaminas (tiamina, niacina, retinol y vitaminas B₆ y B₁₂) y minerales (p.e. Fe hemo y Zn de alta biodisponibilidad) y otros no menos importantes como Se, Na, K y Co (23). En la Tabla 2, adaptada de Delgado-

Pando (24), se resume la composición nutricional de los principales tipos de carne roja (vacuno y cerdo) en EEUU, Reino Unido y España.

Tabla 2. Composición nutricional por 100g de carne de vacuno y cerdo procedente de diferentes países.

	VACUNO			CERDO		
	1*	2	3	1	2	3
Energía (kcal)	126	129	131	144	124	155
Proteína (g)	21,0	22,5	20,7	21,2	21,8	20,0
Grasa (g)	4,0	4,3	5,4	5,9	4,0	8,3
AGS (g)	1,4	1,7	2,2	2,0	1,4	3,2
AGM (g)	1,6	1,9	2,5	2,7	1,5	3,6
AGP (g)	0,2	0,2	0,2	0,6	0,7	0,6
Niacina (mg)	6,2	9,7	8,1	4,8	6,9	8,7
Tiamina (mg)	0,1	0,1	0,1	1,0	1,0	0,9
Vitamina B ₁₂ (µg)	1,5	2,0	2,0	0,7	1,0	3,0
Hierro (mg)	1,8	2,7	2,7	0,9	0,7	1,5
Cinc (mg)	3,9	4,1	3,8	2,0	2,1	2,5
Selenio (mg)	26,0	7,0	3,0	32,4	13,0	14,0
Sodio (mg)	54,0	63,0	61,0	54,0	63,0	76,0
Potasio (mg)	323,0	350,0	350,0	384,0	380,0	370,0

*1, EEUU; 2, Reino Unido; 3, España. Adaptado de Delgado-Pando (24).

Es de resaltar que en la actualidad, se consumen carnes con aproximadamente un 10% menor contenido de grasa que hace 40 años, debido entre otros aspectos a la mejora de especies por selección genética y métodos de alimentación del ganado (25).

El consumo de carne y productos cárnicos supuso el 28% del aporte total de proteína en la dieta (Tabla 3), lo que evidencia la importancia de su ingesta. Según esos datos se superó el 100% de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para las proteínas, caso habitual en los países desarrollados. Según la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) el valor de referencia óptimo establecido para las proteínas es del 15% de la energía total de la dieta (26), en este caso se alcanzó el 17-18%, estando prácticamente toda la población por encima de estos objetivos nutricionales (27).

La carne y productos cárnicos aportan el 23% de la cantidad total de lípidos de la dieta, el 29% de la cantidad total de ácidos grasos saturados (AGS), el 21% de ácidos grasos monoinsaturados (AGM), el 16% de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y el 17% del colesterol (Tabla 3). Sumando la contribución energética del grupo de carne y derivados al de los aceites y grasas, se alcanza casi el 47% del aporte energético de la grasa total (27).

La carne y los productos cárnicos son fuente

importante de vitaminas del grupo B (Tabla 3). Estos alimentos aportan el 21% de vitamina B₁, el 15% de riboflavina, el 22% de equivalentes de niacina, el 23% de vitamina B₆ y el 15% de vitamina B₁₂ del total de la dieta. Debe resaltarse que la carne y los productos derivados son la principal fuente de vitamina B₆ y la segunda de niacina; además, junto con el pescado y otros productos de origen animal (como huevos y leche), son la única fuente natural de vitamina B₁₂ (28). La ausencia de carne en la dieta hace difícil alcanzar las ingestas recomendadas de este grupo de vitaminas. El contenido de folatos de este grupo de alimentos está entre 3-10 µg/100 g, pero en el paté se sitúa en torno a 19 µg/100 g, ya que el hígado tiene un alto contenido de esta vitamina (192 µg/100 g). Por lo tanto, su consumo, puede contribuir a alcanzar las ingestas recomendadas de esta vitamina. Esto es de gran importancia nutricional ya que es uno de los micronutrientes deficitarios de la dieta española (28).

Respecto al consumo de vísceras, recordar que su ingesta ha disminuido de forma determinante, siendo mucho menos apreciadas por los españoles que antaño. Como botón de muestra recordar el altísimo contenido de ácido docosahexaenoico (DHA) de los sesos, el aporte de folato y muchas vitaminas del grupo B del hígado.

Tabla 3. Perfil nutricional de la dieta española media y su relación con el consumo de carne y derivados.

Nutrientes	Ingesta total/día	Nutrientes aportados por la carne	Contribución (%) de la carne a la ingesta de cada nutriente
Energía (kcal)	2293	390	17
Proteína (g)	98,68	27,6	28
Hidratos de carbono (g)	221,2	0	0
Grasa (g)	104,1	25	24
Ácidos grasos saturados (g)	29,2	8,5	29
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	43,6	9,2	21
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	14,1	2,3	16
Colesterol (mg)	380	64,6	17
Hierro (mg)	14,9	2,4	16
Cinc (mg)	9,6	2,5	26
Magnesio (mg)	375	33,8	9
Sodio (mg)	2526	530	21
Potasio (mg)	3951	514	13
Fósforo (mg)	1392	251	18
Selenio (µg)	58,6	9,4	16
Tiamina (mg)	1,9	0,4	21
Riboflavina (mg)	1,5	0,23	15
Equivalentes de niacina (mg)	42,5	9,4	22
Vitamina B6 (mg)	1,8	0,41	23
Vitamina B12 (µg)	7	1,05	15
Vitamina A*(µg)	735	44,1	6
Ácido fólico (µg)	281	14,1	5
Vitamina D (µg)	4	0,08	2
Vitamina E (mg)	14,1	0,28	2

*Equivalentes de retinol, actividad de retinol y carotenoides. Adaptado de Delgado-Pando (24).

4. RIESGOS PARA LA SALUD

La carne es un alimento rico en nutrientes que se consume regularmente por la mayoría de la población. Sin embargo, hay una gran preocupación por la ingesta de carne roja y/o procesada pues muchos estudios asocian la ingesta de estos productos con incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes tipo 2 (DMT2), las enfermedades cardiovasculares (ECV) y diferentes tipos de cáncer. De resultados de estos estudios muchos organismos estatales y no estatales relacionados con la salud han recomendado la restricción de la ingesta de estos productos (29, 30).

Sin embargo, creemos que estas recomendaciones, realizadas al amparo de objetivos de salud, no son lo suficientemente objetivas y merecen, cierto grado de crítica y discusión como recogen diferentes publicaciones entre las que nos gustaría resaltar la reciente de David M. Klurfeld (31) o la de nuestro grupo (32).

Es importante tener en cuenta que, casi con seguridad,

nunca habrá pruebas controladas tanto de consumo de carne (o de cualquier otro alimento) como de criterios de evaluación de enfermedades crónicas, debido al coste, tamaño necesario de la muestra de estudio, tiempo requerido, así como todo lo relacionado con el cumplimiento de los consejos dietéticos, tanto en el grupo de intervención como en el de control.

También existe un dilema moral, pues si se considera la carne como un factor de riesgo para cualquier enfermedad, con base en la interpretación de los datos actuales, no sería ético alimentar a un grupo de sujetos con una cantidad de carne que presumiblemente pueda producir o incrementar la posibilidad de una enfermedad. Además, la mayoría de los datos disponibles en los que basar las recomendaciones dietéticas derivan de estudios observacionales de personas siguiendo un estilo de vida libre.

Hay que tener presente que los estudios transversales que se realizan en un determinado momento, no pueden relacionar causa y efecto por sí solos. Este hecho fue

postulado por Hill hace 50 años, enumerando nueve tipos distintos de evidencias que podrían ayudar a reafirmar los resultados de los estudios observacionales; estos postulados siguen gozando de buena consideración (33). Los nueve tipos de evidencias incluyen: fuerza, que Hill creía que era, de lejos, la más importante, consistencia, especificidad, temporalidad, gradiente biológico, verosimilitud, coherencia, experimentación y analogía. Los postulados de Hill son aceptados y considerados tanto por aquellos que están a favor como por los que están en contra de utilizar solo los estudios observacionales para obtener conclusiones sobre la causalidad.

A menudo, las consideraciones de Hill son enumeradas como criterios a cumplir. Según Hill cuantos más tipos de evidencias dispongamos, más probable será concluir causalidad de la relación. También escribió que el grado de evidencia necesario para conseguir que la gente deje el azúcar y la grasa debería ser más fuerte que reemplazar un producto químico de uso industrial cuando se encuentra disponible una alternativa más segura (33). La posición de Hill ha generado un gran debate sobre este asunto durante décadas.

Entre los estudios observacionales, aquellos del tipo caso-control se consideran hoy por hoy que aportan poca evidencia en causalidad debido a los tipos de encuestas nutricionales utilizadas entre casos recientemente diagnosticados para una enfermedad dada y los controles que no tienen tal condición (31). Esto atañe también a estudios prospectivos de cohortes y existe la creencia en epidemiología nutricional que tales estudios pueden predecir causa y efecto, aunque tal asociación ha sido criticada en otras disciplinas. Los estudios de cohortes se diseñan de tal forma que los participantes usualmente no han sido diagnosticados de estar seriamente enfermos y siguen dietas que se han valorado al comienzo del estudio, y a veces, a intervalos regulares durante el seguimiento del estudio (31). Este último aspecto es importante, ya que en muchos estudios que evalúan las relaciones entre ingesta de alimentos o patrones nutricionales con prevalencia de enfermedades crónicas, se realiza sólo una única determinación de la ingesta dietética y se asume que la dieta de los participantes no cambia durante la duración del estudio, el cual, a menudo, se extiende durante 10 a 20 años. Los estudios de seguimiento a corto-plazo abundan en la bibliografía, pero tiene poco valor por la posibilidad de la causalidad inversa que supone que la presencia de enfermedad no diagnosticada a menudo resulte en cambios en la dieta.

4.1. Consumo de carne y derivados y mortalidad global.

En 2013 y 2014 se publicaron dos revisiones sistemáticas en forma de meta-análisis sobre consumo de carne y mortalidad (34, 35). El primero incluía 9 estudios prospectivos y el último 13. Llama la atención el dispar número de trabajos incluidos en ambos estudios a pesar de que las publicaciones estuvieron separadas sólo por 3 meses, lo que sugiere que las revisiones sistemáticas dependen enormemente de la estrategia de búsqueda, de

las bases de datos seleccionadas y de los criterios de inclusión/exclusión considerados. En ambos meta-análisis se señala que el total de estudios incluidos fue menor al revisado.

Otro aspecto central es dónde se realizaron los estudios: Norteamérica, Europa, Australia y Asia, siendo evidente que a pesar de los intentos de globalización, no pueden ser tratados como entidades simples, dadas las diferencias en la forma tradicional de cocinar y en los componentes básicos dietéticos en dichas zonas geográficas: contenidos de productos vegetales (cereales, verduras, frutas), preferencia por diferentes tipos de carnes rojas o procesadas, número de veces que se consumen por semana, método de cocción, sin olvidar la presencia de factores de confusión (tabaquismo, consumo de bebidas alcohólicas, obesidad, actividad física, contaminación, estrés, etc.) (31).

Dado que tales estudios son muy heterogéneos parece que no deberían haber sido analizados de forma conjunta, al menos aquellos en los que se señala un riesgo relativo reducido. Sin embargo, ambos meta-análisis muestran incrementos significativos del riesgo de mortalidad por todas las causas con el consumo elevado de carne procesada, mientras que el de carne roja, no estuvo o sólo débilmente asociado con la mortalidad total (30). El meta-análisis de Larsson y Orsini (35) calcula un riesgo relativo (RR) global para todas las causas de mortalidad y el consumo de carne procesada de 1,23 (IC 95% 1,17-1,28 para los intervalos de confianza del 95%) a partir de 5 estudios; que el de carne no procesada fue 1,10 (IC 95% 0,98-1,22) teniendo en cuenta seis estudios y el de carne total 1,29 (IC 95% 1,24-1,35) a partir de 5 estudios. En un análisis dosis-respuesta, el consumo de carne procesada y de carne roja total, pero no el de carne roja no procesada se asoció significativamente con incremento del RR de mortalidad total. Es llamativo que el RR para el consumo de carne total sea más elevado que el de carne procesada, cuando en muchos estudios el RR incrementado se atribuye al consumo de este tipo de carne. En el meta-análisis de Abete y col. (34) el RR para mortalidad total y consumo de carne procesada fue 1,25 (IC 95% 1,07-1,45) procedente de 5 estudios; 1,04 (IC 95% 0,92-1,17) para carne roja no procesada y 1,10 (IC 95% 0,94-1,30) para el consumo de carne roja total.

Desde principios de la segunda mitad del siglo XX (34) se ha venido asociando la ingesta de carne y derivados con enfermedad, no obstante cabría especificar que cualquier alimento cuando se ingiere de forma inadecuada, en términos de cantidad, calidad y circunstancias, puede derivar en trastornos de la salud. En España, según la OMS, el 60% de las defunciones se deben a ECV o están relacionadas con algún tipo de cáncer (37). Para esta organización la dieta y por ende la nutrición son factores determinantes para la aparición y progresión de estos dos grupos de enfermedades.

Las relaciones entre consumo de cárnicos y enfermedades degenerativas se basan preferentemente en estudios epidemiológicos y mucho menos en estudios de

Are meat and meat product consumptions harmful? ...

intervención. Podríamos clasificar en cuatro grandes grupos los elementos presentes en la carne que pueden ser perjudiciales cuando se ingieren de forma excesiva (38):

a) Presentes naturalmente en el animal (por ejemplo: grasa, colesterol y residuos contaminantes)

b) Añadidos durante el procesado por razones tecnológicas, microbiológicas o sensoriales (como sal, nitritos, fosfatos, etc.)

c) Producidos durante el tratamiento tecnológico (contaminación con bacterias o desinfectantes, compuestos tóxicos generados durante el cocinado, etc.)

d) Desarrollados durante el almacenamiento y/o comercialización (productos de la oxidación lipídica, migraciones del embalaje, aminoras biógenas, etc.)

En la actualidad se busca de forma imperiosa reducir el contenido de estos compuestos potencialmente perjudiciales, e incrementar el de otros mediante diferentes técnicas y métodos nutricionales que pueden encontrarse en diferentes revisiones (21).

A su vez podemos clasificar las principales patologías que pueden asociarse a un consumo inadecuado de carne y derivados en:

4.2. Obesidad/Sobrepeso

La OMS define el sobrepeso y la obesidad como acumulación anormal o excesiva de grasa que puede resultar perjudicial para la salud. De hecho el sobrepeso y la obesidad están entre los 5 primeros factores de riesgo que más muertes causan en el mundo (39).

Aunque no existe una clara evidencia relacionando obesidad y consumo de carne, la carne y los productos cárnicos se consideran alimentos calóricos por su elevado contenido en grasa, contribuyendo, como hemos comentado el grupo de carne y derivados aproximadamente un tercio del total de los AGS de la dieta. Estos ácidos grasos repercuten más que otros en la adipogénesis y resistencia a la insulina, dos factores claves en la obesidad (40). Sin embargo, y como compensación, la alta cantidad de proteína que caracteriza a este alimento produce un efecto saciante que facilita un mantenimiento o incluso pérdida de peso corporal (41).

En la revisión sistemática de Fogelholm y col. (42) se estudiaron 8 artículos en los que se relacionaba consumo de carne y peso corporal. Se incluyeron diferentes tipos de carne: de aves, procesada y roja no procesada. Se encontró relación positiva con la ganancia de peso, índice de masa corporal (IMC) y el perímetro de cintura. En 6 de ellos se señaló relación positiva con la ganancia de peso, el IMC y el perímetro de cintura; en dos no se encontró ninguna relación significativa y en uno la relación, fue inversa. Aunque todos los estudios fueron considerados de alta calidad y con pocas vías de confusión debe quedar claro que aquellos individuos con mayor ingesta de carne normalmente consumen menos vegetales y frutas y tiene características de comportamiento que afectan de manera negativa e indudable a diferentes condiciones de salud.

4.3. Enfermedades cardiovasculares

Se denominan ECV a aquellas que afectan a los vasos sanguíneos y/o al corazón, y estas son: cardiopatías: coronarias, reumáticas y congénitas; arteriopatías periféricas; enfermedades cerebrovasculares, entre las que se encuentran los accidentes vasculares cerebrales (AVC) y trombosis venosas profundas y embolias pulmonares.

Las ECV son la principal causa de muerte en el mundo. Según la OMS (39) los factores asociados a este tipo de enfermedades son: el consumo de alcohol y tabaco, la hipertensión arterial, un elevado IMC, niveles elevados de colesterol y glucosa en sangre así como una baja ingesta de frutas y verduras y la inactividad física. También el aporte excesivo de ácidos grasos saturados es un factor a tener en cuenta.

La revisión de Abete y col. (34) también examinó la relación con mortalidad por ECV y enfermedad isquémica cardíaca (IHD). Tanto el consumo de carne procesada como el de carne roja se asoció con RR de ECV pero no de IHD. Por ello, estos últimos autores piden precaución a la hora de interpretar los resultados, siendo al parecer inconsistentes, dada la coincidencia de factores de riesgo y la patogenia de CVD e IHD, la heterogeneidad entre estudios analizados en el meta-análisis y la existencia de factores residuales de confusión. También es importante comentar que el quintil de ingesta más elevada difiere netamente (por lo menos 5 veces) entre estudios para la carne procesada y tipo de carne procesada. Muy pocos estudios han relacionado consumo de carne y fallo cardíaco o enfermedad arterial coronaria. Un estudio en hombres suecos determinó la ingesta de alimentos únicamente a nivel basal mientras que el estudio se prolongó por más de 11 años. Se encontraron 2891 casos de fallo cardíaco, siendo fatales 266 de ellos (43). Aquellos varones que habían reportado consumir más de 75g/día de carne procesada tuvieron un RR de 1,28 (IC 95% 1,10-1,48) respecto a los que comieron menos de 25g/día de padecer fallo cardíaco y un RR de 2,43 (IC 95% 1,58-3,88) de mortalidad debida al fallo cardíaco. El consumo de carne no procesada no se asoció con ningún incidente o fallo fatal cardíaco.

De forma similar otro estudio (44) encontró que el consumo de 50 g/día de carne procesada implicaba un RR de enfermedad coronaria de 1,42 (IC 95% 1,07-1,89) y el de 100 g de carne roja no procesada un RR de 1,00 (IC 95% 0,81-1,23).

Como ya hemos señalado, los productos cárnicos son ricos en AGS, los cuales son considerados como los mediadores más importantes de los efectos adversos del consumo de carne sobre la salud. La preocupación creciente por la salud está llevando al consumo de cortes con menos grasa (con alrededor de 10g de grasa total y 4,5 de AGS por 100 g de carne). En estudios de intervención con dieta se ha observado claramente reducciones en diferentes factores de riesgo de ECV, tales como colesterol total, LDL-colesterol, apolipoproteínas AI y CIII y presión arterial sistólica, así como un incremento del índice de

aumentación (una medida de la reactividad vascular) (45, 46). En un meta-análisis de 124 trials controlados al azar, comparando consumo de carne de bovino frente a la de aves o pescado, no se encontraron diferencias significativas en los cambios de lípidos y lipoproteínas (47).

No obstante, aunque diferentes estudios asocian la ingesta de carne con el riesgo de padecer ECV (48, 49), debido a la dificultad para calcular con exactitud la ingesta de alimentos o nutrientes y teniendo en cuenta que estos no se ingieren de forma aislada sino en combinación con otros, los científicos han determinado usar análisis de patrones alimentarios más que alimentos aislados para determinar la relación de la dieta con los riesgos de padecer ECV (50).

Por ello resulta muy complicado aislar el papel de la carne –incluyendo la carne procesada– dentro de un patrón dietético. A este respecto, en un meta-análisis de ocho estudios de cohorte no se encontró asociación entre el consumo de carne como causa de riesgo de padecer enfermedades coronarias (51).

4.4. Diabetes tipo 2

La Diabetes Mellitus es una enfermedad compleja que se acompaña de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas por un defecto de secreción y/o acción de la insulina cuyo resultado es una hiperglucemia crónica (52). Cuando se trata de un defecto de secreción de insulina hablamos de Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) mientras que si se trata de un defecto en la acción de la insulina, nos referimos a DMT2.

La relación del consumo de carne con DMT2 se revisó en un meta-análisis, donde se asoció un alto consumo de carnes rojas con el riesgo de padecer esta enfermedad; si bien, no se descartaron factores de confusión que hayan llevado a esa conclusión (53). Análisis más actuales aportan conclusiones similares; no obstante, la asociación apunta en mayor medida al consumo de carnes procesadas (54). Pese a todo ello, aún existen inconsistencias que no permiten establecer la cantidad de carne a partir de la cual pueda aumentar el riesgo de padecer DMT2 (50).

4.5. Cáncer

El término cáncer reúne una elevada diversidad de condiciones patológicas caracterizadas por un crecimiento incontrolado y desordenado de células que pueden hacerse ectópicas invadiendo y destruyendo tejidos (55, 56). Esta enfermedad puede originarse en cualquier parte del cuerpo. Entre los diferentes tipos de cáncer, los más comunes son los carcinomas que derivan de células que cubren superficies externas e internas (piel, pulmón, mama, próstata, hígado, colon, etc.).

El desarrollo del cáncer depende del control y funcionamiento del ciclo celular. La precisión con la que el ciclo celular acontece posibilita la replicación celular. Sin embargo, este control está sujeto a alteraciones por la inestabilidad del genoma pudiendo producirse mutaciones

irreversibles que impliquen la pérdida de control del crecimiento celular. Este mecanismo es altamente dependiente de unas proteínas conocidas como quinasas dependientes de ciclinas (cdk). La concentración y regulación de tales ciclinas constituyen los puntos de control (*check-points*) del ciclo celular y controlan la actividad metabólica (en fase G1), la capacidad para entrar en mitosis (duplicación de ADN en fase G2) y los propios mecanismos que tienen lugar durante la mitosis (en fase M, por ejemplo en la metafase que asegura la recepción de una copia de cada cromosoma en cada una de las dos nuevas células) (56-58). Por ello, los estudios que relacionan consumo de alimentos con desarrollo de cáncer deben buscar, entre otros aspectos, modificaciones en las ciclinas y en las quinasas dependientes de ciclinas.

No obstante, recientemente se ha señalado la relevancia sobre la expresión génica de factores epigenéticos. Tales factores pueden influir en la complicada red de interruptores que darían a condiciones favorables para la aparición de cáncer. Es decir, no sólo es importante poseer o no unos genes concretos que se han heredado, también es importante conocer si están o no activados (55, 59, 60).

También existen otros sensores mediante los que se evita la transmisión de una información genética errónea y las células se autodestruyen, mediante apoptosis. Mediante este mecanismo se eliminan células dañadas, irreparables y las envejecidas. La pérdida de balance entre proliferación normal y apoptosis genera aumento del riesgo de formación de un tumor. Las mutaciones o cambios moleculares se asocian frecuentemente con la expresión de oncogenes, de genes supresores de tumores y de genes reparadores de ADN. Las tumoraciones pueden ser hiperplásicas, ya que no modifican el ordenamiento celular del tejido) o displásicas modificando la estructura del tejido. Estas últimas llegar a ser malignas, pudiendo migrar, entrar en tejidos vecinos o ser capaces de hacer metástasis penetrando en vasos linfáticos y sanguíneos, diseminándose e invadiendo y creciendo en tejidos lejanos (55, 56, 59).

Las causas por las que una célula normal se transforma y pierde el control de su crecimiento dependen de factores de riesgo de índole diversa que aumentan la probabilidad del desarrollo del cáncer. Se piensa que hasta el 80% de los cánceres en personas con menos de 65 años podrían evitarse con modificaciones en el estilo de vida, en la que la dieta tiene un papel indiscutible. El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo y su incidencia es muy variable de unos países a otros lo que resalta de nuevo la importancia del estilo de vida y/o dieta (60).

En el punto de control del ciclo celular que previene la transición de G1 a S existe un sensor que detecta daños en el ADN, es la proteína quinasa ATM que participa en la fosforilación de dos proteínas supresoras de tumores la *p53* y el *pRB* (o *pRb* proteína de retinoblastoma). Cuando la *pRB* se defosforila, interacciona con el factor de transcripción E2F y ambos unidos previenen la transcripción (inhiben) de los genes necesarios para que

progrese el ciclo celular. La CDK2 es la quinasas dependiente de ciclina que fosforila el pRB en la fase S (56, 57, 59). Si se inhibe la CDK2 se evitará la fosforilación y por tanto el avance del ciclo. Es decir, uno de los mecanismos anticancerígenos de los componentes de la dieta debe ser la inhibición de la acción de los componentes genotóxicos de la misma o a través de mecanismos epigenéticos. No obstante por el objetivo de este trabajo no incidiremos más al respecto.

El Fondo Mundial para la Investigación sobre el Cáncer (World Cancer Research Fund, WCRF) junto con el Instituto Americano de Investigación del Cáncer (American Institute for Cancer Research, AICR) llevan estudiando desde hace varios años la influencia de la dieta en la prevención del cáncer. En un informe del año 2007 (61) se propone una reducción de la ingesta de carnes rojas hasta un máximo de 71,4 g/día y un consumo mínimo o nulo de carnes procesadas (aquellas saladas, curadas o ahumadas, o a las que se haya añadido conservantes químicos), ya que han encontrado que su consumo elevado aumenta el riesgo de padecer cáncer colorrectal y posiblemente otros tipos de cánceres (61). Un informe del WCRF/AICR de 2010 (62) insiste en la asociación positiva entre el consumo de carne roja y procesada y el riesgo de padecer cáncer de recto y colon, aunque con un RR algo menor al del informe global (62).

No obstante, existe un amplio debate al respecto, ya que diversos autores argumentan que muchas evidencias son inconsistentes, lo que impide categóricamente emitir dicha asociación (50, 63, 64). Es más, revisiones recientes descartan, que con la evidencia científica actual, se pueda asegurar que exista una relación significativa y relevante entre el consumo de carne roja y el riesgo de padecer cáncer colorrectal (65, 66). Parece, por tanto, que existe cierta dificultad a la hora de establecer dicha relación y que la comparación entre estudios es controvertida, ya que muchos estudios difieren entre sí en infinidad de variables (33). Así, términos como a qué se considera carne roja y a qué carne procesada, varían de unos estudios a otros; la precisión con la que se registra el consumo de carne es muy pequeña ya que el cocinado, tiempo de preparación y contenido en grasa es variable, así como el método de recogida de datos; la dificultad en separar el efecto de los componentes y el de los propios alimentos es otro factor a tener en cuenta, ya que muchas veces es el patrón dietético el que marca la asociación (50, 63, 64, 67).

Los estudios que relacionan el estilo de vida y por ende el consumo alimentos y nutrientes con el cáncer de colon están aún sin dilucidar; es más, los estudios que relacionan oncogenes o proto-oncogenes con factores dietéticos son bastante escasos y muy novedosos (60). En una publicación del estudio epidemiológico EPIC Norfolk en el que se testaron más de 25.000 individuos entre 45 y 79 años en el Reino Unido se realizó un estudio sobre hábitos de vida y se obtuvieron datos sobre los genes *BRAF* y *K-ras* los cuales se conocen codifican proteínas que actúan en la vía de señalización ERK, la cual media la respuesta celular a factores de crecimiento, regula elementos del

ciclo celular, apoptosis y diferenciación (68). Se identificaron 186 adenocarcinomas y 16 adenomas. Se encontraron mutaciones activadoras en ambos genes en el cáncer colorrectal, cuya frecuencia fue del 4-13% para *BRAF* y del 20-50% para el *K-ras*. De los 41 casos con mutación *K-ras*, 22 tuvieron transición Gly a Ala (60).

Excepto para el consumo de carne “blanca” que fue más elevado en mutantes *K-ras* (29,5 g/día vs. 17,4 g/día) no se encontró asociación entre el aporte de ningún alimento y la prevalencia de individuos con mutación *BRAF* o *K-ras*. No obstante, en los 22 individuos con mutación *K-ras* y transición Gly a Ala ingirieron menos frutas y vegetales que los portadores de otras mutaciones *K-ras* (60).

Por todo ello, parece claro, y según se desprende de todos los estudios analizados, que existen factores de confusión que dificultan encontrar la asociación real entre el riesgo de cáncer y consumo de carne y derivados. Creemos además que la guarnición que acompañe a la carne que se consuma tiene al menos un papel potencialmente protector muy importante (55), por lo que técnicas culinarias como el estofado, el sofrito además de incrementar el contenido de fibra y compuestos bioactivos, pueden reducir la expresión de los oncogenes, contribuyendo por tanto a reducir la iniciación y desarrollo del cáncer.

En un editorial de la Sociedad Española de la Nutrición (SEN) el profesor Salvador Zamora (69) proponía unas pautas de ingesta que se traducen en 14 raciones de carne y alimentos ricos en proteínas de origen animal a la semana distribuidas de la siguiente manera (*sic*): “tres raciones de carne, tres de pescado, tres de huevos, tres de legumbres y dos de embutidos. Las tres raciones de carne a la semana incluyen pollo, pavo, cerdo, ternera, cordero, conejo, buey, avestruz..., por lo tanto, si se cumple el principio general de la variedad, que es especialmente importante, pasará más de una semana antes de repetir un tipo de carne cuyo consumo se recomienda que no sea frecuente, como es el caso de la carne roja” (69). También advierte del peligro de generalizar sobre un grupo de alimentos tan variados. “En cuanto al consumo de embutidos, primero sería conveniente matizar de qué estamos hablando cuando hacemos referencia a este grupo de alimentos, ¿es lo mismo un salchichón, una mortadela, una sobrasada, un blanco o una salchicha? No, evidentemente no, son alimentos muy diferentes en composición de nutrientes además de en componentes no nutritivos. Por lo tanto, para establecer las recomendaciones de consumo de embutidos, habría que tener en cuenta el tipo, cantidad y calidad tanto de la carne como de la grasa, y la de otros componentes tanto nutritivos como no nutritivos que se emplean en su elaboración. Por ello, algunos embutidos podrían incluirse en la dieta con una frecuencia parecida a la de la carne de la que proceden, por sus características nutritivas y valor energético, y otros habría que consumirlos ocasionalmente, aunque estén especialmente sabrosos. El mismo profesor Zamora señala textualmente (69) que “es importante sugerirle a los expertos que hagan una clasificación

nutricional de los embutidos, con el fin de establecer unas pautas para su inclusión en las recomendaciones de una alimentación prudente y saludable”.

Como ya hemos señalado, los cánceres de colon, recto y el combinado colorrectal se han relacionado de forma consistente con el consumo de carne roja en estudios de tipo observacional. No obstante, existe una variación geográfica enorme en la incidencia, de cáncer colorrectal con diferencia entre países el orden de 20 a 25 veces, sugiriendo un papel adicional de otros factores ambientales. En 2007, la Fundación Mundial de Investigación sobre el cáncer realizó una revisión sobre la relación dieta-cáncer y concluyó que la ingesta de carne roja a y procesada constituían factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de colon (61). Dado que dicho estudio recibió muchas críticas se realizó una actualización en 2011 (30), pero no se modificaron las conclusiones. La actualización del 2011 concluyó que el consumo de 100 g/día de carne roja incrementaba el RR por 1,17 y el de 50g/día por 1,18 (30). Un meta-análisis independiente de 103 estudios de cohortes llegó a conclusiones similares, donde el grupo de mayor ingesta respecto al de menor incrementaba el RR en 1,21 (IC 95% 1,13-1,29) mientras que para el de carne procesada la ingesta elevada respecto a la baja multiplicaba el RR por 1,19 (IC 95% 1,12-1,27). De nuevo los mismos factores de confusión se asociaron con la ingesta de carne: incremento del peso corporal, reducción de la actividad física, consumo de tabaco e ingesta elevada de alcohol, y reducción del consumo de frutas y verduras. Huxley y col. (70) autores de este meta-análisis concluyeron que tales factores debía ser objetivo de campañas públicas de salud para reducir la incidencia de cáncer colorrectal. En otro meta-análisis (71) que analizó la relación entre consumo de carne roja y cáncer colorrectal se calculó entre consumo elevado y bajo un RR de 1,12 (IC 95% 1,04-1,21) entre consumo elevado y bajo, señalando los autores la gran heterogeneidad existente entre los estudios revisados. El RR para hombres fue 1,21 (IC 95% 1,04-1,42) mientras que para mujeres 1,01 (IC 95% 0,87-1,17). Es decir en las mujeres no se encontró asociación significativa entre el nivel de ingesta y la incidencia de cáncer. Estos autores concluyen que los datos observacionales fueron insuficientes para garantizar una asociación estadística independiente entre el consumo de carne roja y el riesgo de cáncer colorrectal por su debilidad estadística, heterogeneidad entre los estudios, inconsistencia entre los subgrupos, y la existencia de otros factores de confusión tanto alimentarios como ambientales.

En otro meta-análisis (72) también se encontraron resultados similares con RR para el consumo elevado vs. reducido de carne roja o carne procesada de 1,22 (IC 95% 1,11-1,34). Estos autores también calcularon la relación dosis-respuesta y encontraron un incremento lineal del riesgo hasta 140 g/día, a partir del cual se obtiene una meseta. En un análisis más detallado se observó que el RR de cáncer de colon permanecía, pero para el cáncer de recto no llegaba a ser significativo. Por último en el

reciente meta-análisis de Carr y col. (73), se estudió el consumo de diferentes tipos de carne (buey, cerdo, cordero, ternera, y aves) y concluyó que el consumo de elevado vs. el reducido multiplicaba por 1,24 (IC 95% 1,07-1,44) el RR de cáncer de colon pero no el de recto. Curiosamente el consumo elevado de carne de cordero elevaba el RR de cáncer colorrectal, pero tal asociación no se observó para la ingesta de carne de cerdo o de aves.

Existen diversos estudios respecto al papel de la carne roja y carnes procesadas en otros tipos de cánceres como de esófago, estómago, pulmón, páncreas y endometrio, no obstante las evidencias científicas que pueden llegar a relacionarlos son limitadas (61).

La pretendida potencialidad carcinogénica de la carne se basa en varios factores: método culinario, cantidad consumida y predisposición genética individual (74). Los mecanismos por los que se desarrollaría cáncer colorrectal al consumir carne roja y procesada se basan en el procesado y el uso de algunos aditivos. Quizás un mayor conocimiento de estos mecanismos podría llevar a mejorar el método del procesado sin tener que restringir el consumo de estos productos.

5. EL INFORME DE LA OMS Y SUS IMPLICACIONES

El pasado mes de octubre de 2015 la OMS emitió un comunicado previniendo sobre la peligrosidad de la ingesta de carne roja y/o procesada (4) creando la consiguiente alarma entre la población. Haciéndonos eco de la situación nuestro grupo publicó en la revista de Nutrición Hospitalaria (32) un artículo especial donde se puntualizaban algunos aspectos de dicho informe. Analizando el comunicado, parece claro que el problema estudiado requiere la máxima atención, pero quizás también mucha puntualización. Así, el análisis realizado por la OMS implica, aparte de estudios ya comentados en líneas anteriores, a productos consumidos en cantidades importantes en otros países, particularmente Estados Unidos y Norte de Europa, donde las prácticas culinarias son diferentes y el aporte de alimentos ricos en antioxidantes (frutas, hortalizas y verduras) o en ácidos grasos omega-3 de larga cadena, de reconocida potencialidad anticancerígena (56), se aleja de lo aconsejado; mientras que en España el consumo de derivados cárnicos en los que se encuentran los productos potencialmente peligrosos a los que nos referiremos a continuación ronda cantidades que preconiza la OMS, pero el consumo de frutas y verduras y pescado, en particular graso, es bastante más elevado (32).

El mecanismo más convincente que vincula la carne y el desarrollo de cáncer colorrectal, implica a diversos componentes mutagénicos formados durante el cocinado de la carne a altas temperaturas y considerados iniciadores y promotores de la carcinogénesis en humanos: aminos aromáticas heterocíclicas (AAH), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y las N-nitrosaminas (4)

5.1. Aminas aromáticas heterocíclicas

Las AAH son productos formados en la reacción de Maillard que se originan en el calentamiento de los alimentos. Entre ellas merece destacar la 2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolina (IQ) y la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhIP) que representan los compuestos IQ y no IQ formados por calentamiento de mezclas donde se encuentran creatina, aminoácidos, azúcares y proteínas respectivamente (75). Este tipo de aminas se encuentran en carne asada o cocinada durante tiempos prolongados. El PhIP induce cáncer de mama, colon y próstata en ratas. Las AAH se activan metabólicamente por la hidroxilación del grupo amino catalizada por la vía CYP1A2, esterificación de los derivados N-hidroxilados por encimas de fase II y disociación de los ésteres a iones nitronio reactivos al ADN. Estos iones afectan primero al átomo C8 de la guanina mediante la modificación covalente del ADN, lo cual se evidencia por el aducto formado con un derivado electrófilo de PhIP. Los tumores inducidos por las AAH en ratas contienen mutaciones en los genes que se relacionan con cáncer: *H-ras*, *K-ras*, *p-53*, *APC* y las *β-cateninas*.

No obstante la relación de las AAH con la aparición de cáncer (76) es difícil de establecer porque las cantidades consideradas carcinogénicas en animales son muy superiores a las que se pueden alcanzar al ingerir cárnicos procedentes de fritura (77), por tanto la extrapolación de las AAH al desarrollo de cáncer en humanos debe ser cautelosa. Además en algunos de los trabajos revisados por la OMS (4) las temperaturas a las que se realizaron los experimentos para la producción de AAH son demasiado elevadas (280 °C), temperaturas que no se alcanzan nunca en los usos culinarios de la dieta mediterránea como puede ser la fritura (32).

5.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAP son compuestos generados cuando la carne se cocina sobre una llama (a la parrilla) y/o cuando se emplea la técnica del ahumado, aunque también pueden producirse pero en mucha menor cantidad con otros tipos de cocinado. En este caso las evidencias que los relacionan con cáncer también son débiles (78). Entre los HAP se encuentra el B[a]P sospechoso de producir cáncer en humanos; este aducto es promutágeno y se acumula en

fumadores y personas expuestas por su ocupación (79).

5.3. N-nitrosaminas

Las N-nitrosaminas se forman al reaccionar el nitrito y óxidos de nitrógeno con aminas secundarias y N-alquilamidas (80). Estos son los compuestos que han generado mayor controversia y, por tanto, los que requieren más puntualización.

Los nitratos se encuentran presentes de forma natural en muchos alimentos de origen vegetal. Muchas plantas almacenan nitratos y nitritos en sus tallos y hojas, especialmente cuando se han abonado con nitrato amónico. El agua de bebida también contiene nitratos. Cuando estos nitratos llegan a la boca y por la actividad de la enzima nitrato reductasa de la microbiota bucal se reducen pasando a nitritos (80).

A pesar de que estas sustancias están en las verduras, y por tanto su potencial riesgo puede ser al menos equivalente al de la carne, la European Food Safety Authority (EFSA) reconoce el carácter saludable de estos alimentos y recomienda aumentar su ingesta (81). Como se discutirá más adelante la presencia de compuestos antioxidantes, de naturaleza polifenólica bloquearían, al menos parcialmente, los aspectos negativos atribuidos al consumo de los productos cárnicos.

La adición de nitratos/nitritos como aditivos, y la producción de N-nitrosaminas que se deriva de dicha adición, viene siendo polémica desde hace años. Es por esto que haremos especial atención a estos compuestos.

5.3.1. Funciones de los nitritos

Los nitratos/nitritos se emplean como conservantes de los productos cárnicos. A pesar de su peligrosidad siguen empleándose como aditivos porque su poder protector es muy alto y compensa largamente sus inconvenientes. En la Tabla 4 se muestran los nitratos utilizados actualmente en la industria alimentaria, cuya utilización debe seguir las normas de la directiva de la Unión Europea (82).

A continuación exponemos la importancia de los nitratos/nitritos como aditivos por sus diferentes propiedades.

Tabla 4. Tipos de nitratos y nitritos utilizados en la industria alimentaria.

Aditivo	Nombre	Fórmula
E 249	Nitrito potásico	KNO ₂
E 250	Nitrito sódico	NaNO ₂
E 251	Nitrato sódico	NaNO ₃
E 252	Nitrato potásico	KNO ₃

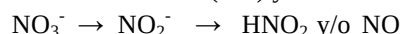
Directiva UE 95/2 (82)

5.3.1.1 Función antimicrobiana

Esta es la actividad más importante de estos compuestos pues protege al consumidor de la

contaminación por bacterias muy peligrosas para la salud ya que alteran el metabolismo microbiano afectando a nivel enzimático el crecimiento de los microorganismos (83).

Los nitratos por sí mismos carecen de esta actividad; se requiere que se reduzcan a nitritos que son los compuestos que ejercen esta función junto con otras sustancias que surgen procedentes de las transformaciones de los nitritos, como el óxido nítrico (NO) y el ácido nitroso (HNO₂).



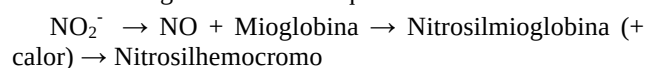
Tal acción se ha constatado en algunas bacterias anaerobias como:

Clostridium botulinum: impiden la germinación de sus esporas evitando la formación de la neurotoxina causante del mortal botulismo (84).

Staphylococcus aureus y *Clostridium perfringens*: inhiben respectivamente el crecimiento de estas bacterias responsables de infecciones gastrointestinales (85) y de la enteritis necrótica (86).

5.3.1.2. Estabilización del color

Al reaccionar la mioglobina con compuestos procedentes de la reducción de los nitritos a través de reacciones complejas de oxidación y reducción, se forma el color rosado-rojizo que se asocia a la carne fresca mediante la siguiente reacción química:



El NO, que finalmente se liga al pigmento para formar nitrosilmioglobina, al sufrir un tratamiento térmico, como en el caso de algunos productos curados, se transforma en nitrosilhemocromo, un pigmento rosado brillante que caracteriza a los citados productos curados (87).

En los embutidos madurados, la reducción de nitratos y nitritos se produce biológicamente mediante bacterias que poseen actividad nitrato y nitrito reductasa; en estos productos el pigmento final es la nitrosilmioglobina, ya que no han sido tratados térmicamente.

5.3.1.3. Sabor y aroma

Brooks y col. (88) ya en los años 40 del pasado siglo relacionaron los nitritos con el sabor y el aroma de los productos curados, observando que los que no contenían nitritos eran sensorialmente mejores. En este caso la participación del NaCl, que se utiliza igualmente en estos procesos, también tiene un papel importante.

5.3.1.4. Función antioxidante

Este efecto se realiza porque los nitratos/nitritos inhiben los mecanismos antioxidativos de los lípidos (89). Cuando el nitrito se une al hierro hemo lo mantiene en estado ferroso evitando su oxidación a férrico.

5.3.2. Riesgos de los nitritos

El uso de estos aditivos conlleva ciertos riesgos para la salud que la OMS se ha encargado de reseñar en su informe (4).

5.3.2.1. Formación de metahemoglobina

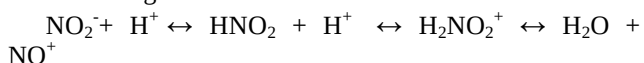
El nitrito a dosis elevadas es tóxico (2 g pueden causar la muerte en humanos) ya que se une a la hemoglobina de la sangre formando metahemoglobina que no puede ni captar ni ceder oxígeno (90). Esta forma modificada de oxihemoglobina se encuentra en la sangre en cantidades muy pequeñas, siendo en individuos sanos menor al 2% del total de hemoglobina. A niveles de 10% de metahemoglobina en sangre, se produce cianosis, con un 20% se manifiestan síntomas de bajo nivel de oxígeno, debilidad, disnea, cefaleas, taquicardia, y con un 60% de metahemoglobina se producen síntomas neurológicos. No obstante, las manifestaciones clínicas en los pacientes con metahemoglobinemia dependen de la magnitud de la metahemoglobina y la susceptibilidad del paciente a la hipoxia (por ejemplo: presencia de enfermedad coronaria o pulmonar). Es especialmente peligroso cuando de niños se trata. De hecho en bebés el consumo de verduras de hoja verde oscuro se pospone una vez cumplidos los nueve meses por el riesgo de formación de metahemoglobina (91).

5.3.2.2. Formación de N-nitrosaminas

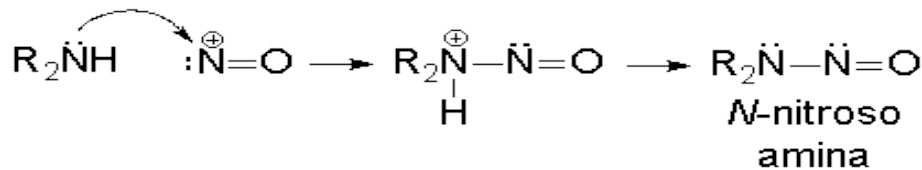
Las N-nitrosaminas se forman por nitrosación de aminas y amidas y otros compuestos nitrogenados (80, 92). Los nitratos son los agentes nitrosantes más comunes. Sin embargo, es necesario que se produzca primero su reducción antes de reaccionar con las aminas. Se ha comprobado que en el caso de los embutidos corre a cargo de bacterias, las de la familia Micrococcaceae. En el curado de las carnes se añaden nitratos y nitritos; éstos últimos, durante el proceso, se reducen a óxido nítrico, óxido nitroso e incluso nitrógeno.

El óxido nítrico puede ocasionar la nitrosación de aminas secundarias, particularmente en presencia de cobre o hierro que actúan como catalizadores. No hay indicios de que el óxido nitroso sea un agente nitrosante, pero el dióxido de nitrógeno que se forma a partir del óxido nítrico, sobre todo en presencia de oxígeno, es un poderoso reactivo para la formación de N-nitrosaminas (93).

El agente nitrosante necesario para la formación de N-nitrosaminas procede de la reacción del ion nitrito (NO₂⁻) con protones del medio, convirtiéndose en ácido nitroso (HNO₂) que, al igual que el nitrito, no tiene capacidad nitrosante, pero es el intermediario de la formación de los verdaderos agentes activos.

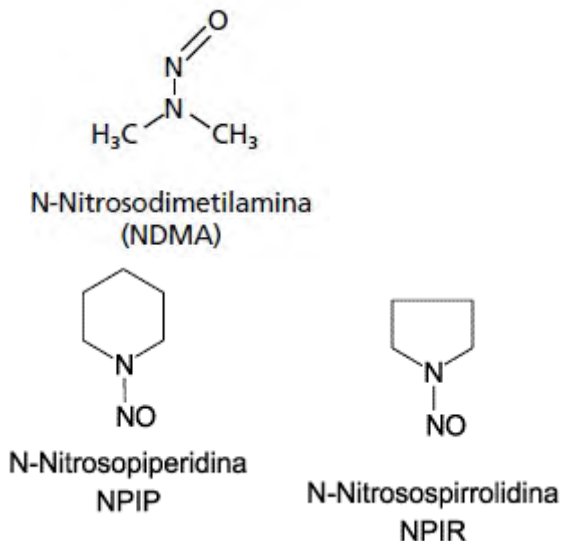


Aunque la mayor parte de las aminas susceptibles de ser nitrosadas que existen en muchos alimentos pueden dar lugar a derivados N-nitroso no volátiles relativamente complejos, los que mayor atención han recibido son, sin lugar a dudas, las N-nitrosaminas volátiles dialquil y heterocíclicas más simples, existentes en los productos cárnicos por ser las más frecuentes y las que tienen mayor poder mutagénico y carcinogénico.



a) La mayoría de las N-nitrosaminas poseen actividad tóxica, genotóxica y cancerígena para un amplio número de especies animales, incluyendo primates (80). No obstante, la nitrosación es un fenómeno complejo que se ve influido por diferentes factores como la temperatura, el pH, la actividad del agente nitrosante y del tipo y cantidad de amina.

Las N-nitrosaminas más habituales son la N-nitrosodimetilamina (NDMA), la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrospirrolidina (NPIR) resultantes respectivamente de la nitrosación de la dimetilamina, piperidina y pirrolidina.



5.3.2.2.1. Factores que influyen en la nitrosación

Entre los múltiples factores implicados destacaremos:

- pH. Se ha comprobado que el pH del estómago es adecuado para la nitrosación; lo que explica la formación *in vivo* de estos compuestos (80).

- Temperatura. La formación de nitrosaminas se ve favorecida por el aumento de la temperatura. Además con temperaturas elevadas se potencia la eliminación de aminas y aminoácidos que pueden ser nitrosados (80).

- Tipo de amina. La capacidad de nitrosarse una amina es inversamente proporcional a su basicidad. También depende de la cantidad de amina presente. Hay una concentración mínima por encima de la cual la formación es mayor; este límite es diferente según la amina (94).

- Catalizadores e inhibidores. Existen varios agentes que afectan la nitrosación, el más importante es el ácido ascórbico ya que es un potente inhibidor de la nitrosación actuando en casi la totalidad de las aminas (95). El tiocianato, sin embargo, actuaría como catalizador (96).

- Presencia de NaCl. La sal común ejerce un poder protector frente a la nitrosación. A pH 4 inhibe la formación de N-nitrosaminas (97).

A todo esto cabría puntualizar, y siempre teniendo en mente el informe de la OMS, que la utilización de nitratos y nitritos –compuestos a los que se les atribuye en parte los efectos perniciosos de la carne procesada– no se emplean en la carne fresca o las salchichas frescas. Además si comparamos la cantidad de nitratos/nitritos presente en la carne procesada con la que se encuentra en otros alimentos considerados “sanos” (Figuras 5a y 5b) vemos que los niveles son menores, o mucho menores (Figura 5a). Su aporte final diario atendiendo a la ingesta de carne procesada supone cantidades inferiores a las que se deben a estos la ingesta de acelgas (Figura 5b).

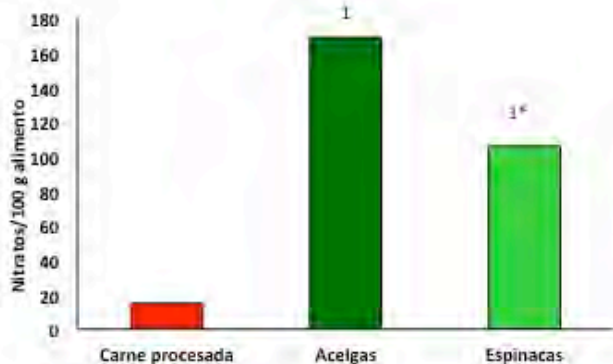


Figura 5a

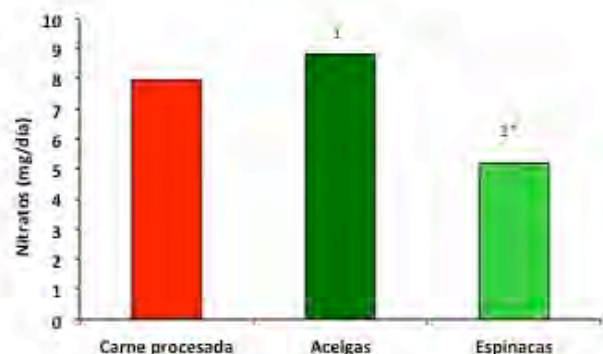


Figura 5b

Figura 5. Nitratos y nitritos en nuestra dieta. **5a.** Comparativa del contenido de nitratos por 100 g de alimento en carne procesada, acelgas y espinacas; **5b** Aporte diario de nitritos en mg de carne procesada, acelgas y espinacas. Adaptado de Celada y col. (32).

¹Fuente: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission to perform a scientific risk assessment on nitrate in vegetables (81). *En la opinión de la EFSA se presentaron combinados los datos de espinacas frescas y congeladas, aunque debe tenerse en cuenta que el nivel de nitratos en espinacas congeladas es inferior al de espinacas frescas.

En la Figura 6 se compara el contenido y el aporte de nitratos de la carne procesada frente a otro tipo de alimentos de origen vegetal. Es de resaltar que multitud de productos incluidos en esa figura (p.e. calabaza, calabacín,

espinacas, lechugas, remolacha, etc) tienen cantidades mucho más elevadas por 100 g de alimento de nitratos que la carne procesada.

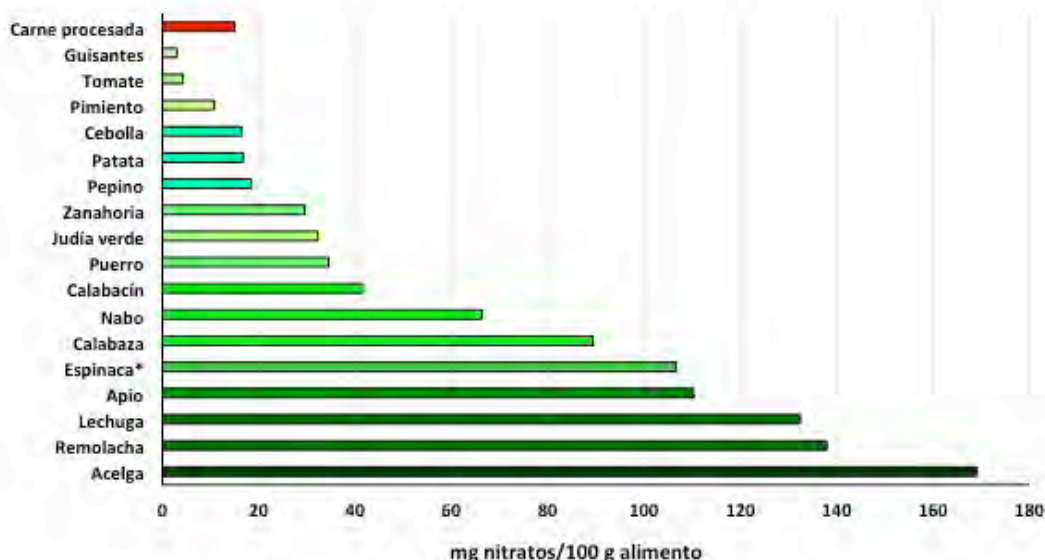


Figura 6. Contenido y aporte de nitratos de la carne procesada frente a otro tipo de alimentos de origen vegetal. Adaptado de Celada y col. (32).

A parte de los factores relacionados en la revisión de la OMS (4) ya comentada, pensamos que también merecen resaltarse otras hipótesis. Así, se ha señalado a la presencia en la carne de altos niveles de hierro como promotor de la carcinogénesis a través de incrementar la proliferación celular, el estrés oxidativo y la señal de hipoxia inducida por hierro (98). Samraj y col. (99) han propuesto recientemente la hipótesis de la “xenosisialitis” (Figura 7) que relaciona la interacción entre un ácido siálico “aberrante” y los anticuerpos circulantes contra ese ácido siálico. Esta interacción resulta en una inflamación crónica que promueve carcinogénesis y también aterogénesis. Esta hipótesis se basa en algunas relaciones indirectas como 1) el consumo elevado de carne en esta población; 2) los altos niveles de marcadores inflamatorios en la población occidental; 3) la procedencia exógena de los ácidos siálicos “aberrantes” implicados; 4) el acúmulo preferente de ellos en células malignas.

Los ácidos siálicos son monosacáridos que se encuentran ampliamente expresados en las unidades terminales externas de todas las membranas celulares de vertebrados y juegan papeles esenciales en las relaciones célula-célula y célula-microambiente. Los más abundantes en la mayoría de las células de los mamíferos son el ácido N-acetil-neuroamínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuroamínico (Neu5Gc). Este último no se encuentra en la etapa post-fetal en los

humanos, debido a la deficiencia o inactivación de la enzima citidin-monofosfato N-acetil neuroamínico hidoxilasa (CMAH) tras el nacimiento o en etapas finales del embarazo. No obstante, se detectan pequeñas cantidades de Neu5Gc en epitelios secretores y en epitelios de vasos sanguíneos pequeños y de gran calibre. A su vez se ha observado acumulación de este ácido siálico en tumores humanos como carcinomas de mama. Samraj y col. (99) señalan textualmente que en ausencia de cualquier otra explicación, el ácido Neu5Gc debe entrar a los tejidos humanos tras la ingestión oral del mismo. Entre las fuentes más ricas en Neu5Gc se encuentran la carne roja y en menos cuantía los productos lácteos. Tanto las aves de corral como los pescados contienen niveles bajos de Neu5Gc, careciendo los vegetales de él.

Ahondado más en la hipótesis que relaciona la ingesta de Neu5Gc y cáncer, Samraj y col. (99) señalan que una exposición temprana a alimentos conteniendo Neu5Gc en presencia de ciertas bacterias comensales (y también patógenas) que incorporan tal ácido siálico en lipooligosacáridos, puede llevar a la generación de anticuerpos que reaccionan como “xeno-autoanticuerpos” contra tejidos humanos que contienen glicanos con Neu5Gc (Figura 7). De hecho esos xeno-autoanticuerpos son encontrados en todos los seres humanos, aunque en cantidades muy variables.

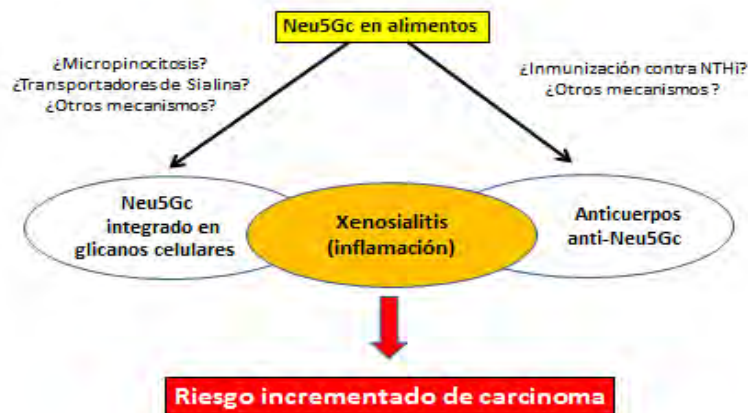


Figura 7. El ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) es incorporado metabólicamente en los glicanos celulares a partir de la dieta, preferentemente de carne y derivados y de leche productos lácteos, originando xenoantígenos. En la sangre circulan anti-Neu5Gc que empiezan a formarse tras la lactancia materna por la incorporación de derivados lácteos (p.e leche o fórmulas de continuación) existiendo al año de vida niveles similares a los del adulto. Estos anticuerpos son inducidos por inmunización frente a bacterias comensales (p.e *Haemophilus influenza* o NTHi) y frente otros patógenos que expresan y captan Neu5Gc. El consumo de alimentos con alto contenido en Neu5Gc incrementaría la formación de inmunocomplejos. Adaptado de Samraj y col. (99).

6. LA IMPORTANCIA DE LA DIETA Y SU PAPEL PALIATIVO EN LA RELACIÓN CARNE-PATOLOGÍA

Una parte importante de la población mundial sigue dietas vegetarianas o semivegetarianas (100). Aunque un aspecto clave fundamental de estas dietas es su contenido preferente en alimentos vegetales, hay una gran diversidad de dietas vegetarianas, tanto en relación a la cantidad, como al tipo y momento de inclusión o exclusión de algunos alimentos (101).

Teniendo en cuenta que la presencia de nitratos y nitritos en algunos vegetales es importante la ingesta de estos compuestos en dietas vegetarianas es elevada (Figura 5), sin embargo la incidencia de cáncer en los seguidores de este tipo de dietas no está aumentada (102).

En la actualidad existe consenso de las ventajas del consumo de dieta mediterránea (DM) en la salud. Muchos estudios y publicaciones avalan al perfil de DM como uno de los más saludables; recientemente se ha publicado una monografía sobre DM (103) en la que tienen especial mención, por el tema que nos atañe los capítulos relacionados con cáncer (104, 105). Como es conocido, la DM es una dieta plural en la que se simultanean multitud de alimentos y cuyas proporciones y frecuencia de consumo han sido representados multitud de veces en forma de pirámide (106) (Figura 8).

Claramente visibles se encuentran en ella productos vegetales con alto contenido en nitratos/nitritos, sin olvidar un alimento estrella, el aceite de oliva (107). Lo mismo ocurre con las célebres pirámides vegetarianas estrictas de los veganos (108) (Figura 8). Lógicamente al diversificar en contenido de alimentos y permitir la inclusión de otros productos de origen animal (p.e. dieta ovo-lacto-vegetariana) el contenido de nitratos/nitritos se reduciría respecto a la vegetariana estricta. Dado que la incidencia y prevalencia de diferente tipos de cáncer en poblaciones mediterráneas y vegetarianas son bajas (104, 105), lo que sí parece claro, teniendo en cuenta las guías nutricionales, es que el consumo de carne y derivados en la población de los países en desarrollo es muy elevada en detrimento del consumo de alimentos de origen vegetal (109).

No debemos olvidar, por otra parte, que la fibra vegetal, particularmente aquella de naturaleza fermentable, afecta a la microbiota intestinal y por ende, a los colonocitos en virtud de formar ácidos grasos de cadena muy corta, como el ácido butírico, que aseguraría la correcta renovación celular en la mucosa digestiva y disminución, por tanto, del riesgo mutagénico (110). Por ello la ingesta de carne o compuestos nitrosantes debe hacerse conjuntamente con productos vegetales que estimulen la actividad de la microbiota.

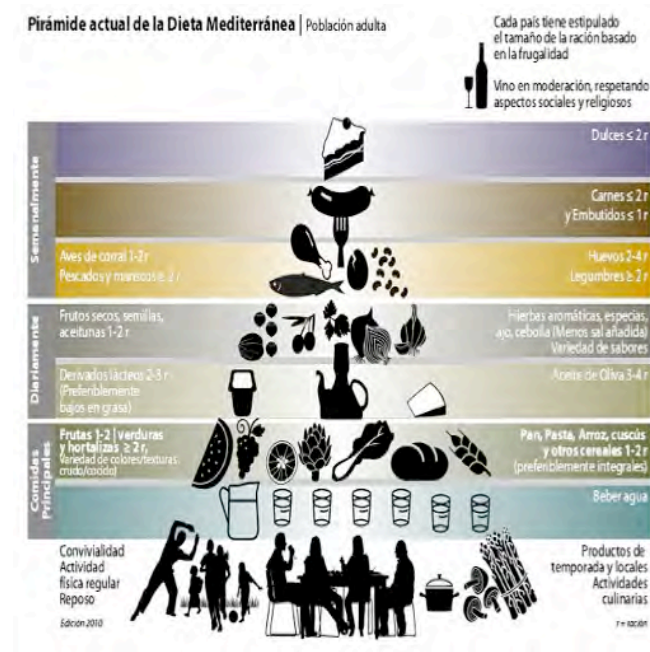


Figura 8. Guías nutricionales. Pirámide nutricional de Dieta Mediterránea, tomado de Serra-Majem y Medina (106); y pirámide nutricional vegana (108).

7. ALARMA SOCIAL. EL PODER DE LOS MEDIOS DE COMUNICACIÓN

El aspecto de la comunicación es muy relevante pues es importante cómo percibe el consumidor las cosas más que lo que realmente sabe o conoce de ellas. En la actualidad el consumidor español se preocupa por la alimentación, especialmente de origen animal después de las alarmas alimentarias acaecidas en el sector como el mal de las vacas locas (111).

Atendiendo a las noticias que aparecieron al hilo de dicho comunicado se pudieron leer titulares tan llamativos como erróneos del siguiente jaez: “las salchichas son tan nocivas como el tabaco o el amianto”. Está claro que la manera de manejar dicha información por parte de algunos medios de comunicación ha sido poco profesional y nada rigurosa provocando confusión entre los consumidores en cuanto al uso de un grupo de alimentos que tienen una gran importancia nutricional y económica en todo el mundo.

Algunos expertos en dieta mediterránea se han manifestado al respecto. El doctor Estruch resaltó en una entrevista (112) que el grado de evidencia no es elevado y no se puede equiparar a este tipo de alimentos con cancerígenos como el amianto o el tabaco, aunque sí hace hincapié en moderar su consumo sin necesidad de demonizarlos.

El informe de la OMS se basa en estudios epidemiológicos y hay que tener en cuenta que la epidemiología, con su gran base estadística, requiere para su comprensión una cierta formación numérica, por lo que es percibida por el ciudadano medio como un elemento que usan los expertos para “decir lo que quieren” (113). La percepción de cierta manipulación hace crecer la

desconfianza en el consumidor.

La industria alimentaria, la administración pública, el sector investigador/científico y los medios de comunicación tienen una gran responsabilidad a la hora de suministrar una información veraz, basada en la experimentación científica, pero explicada de manera asequible para el buen entendimiento de todos, contribuyendo así a mejorar la nutrición y por ende la salud a la vez que se educa e informa a los consumidores para que elijan una alimentación adecuada (114).

Queremos además resaltar que la relación potencial de carne y cáncer es de sobra conocida desde hace tiempo y en particular en los círculos ligados a este tipo de productos. El comunicado de la OMS, dadas las circunstancias, no aporta casi nada nuevo, por lo que cabría preguntarse ¿Qué se esconde tras esta puesta en escena tan llamativa? Y lo que es más importante, tal como señalábamos en nuestra reciente publicación (32): ¿Se acuerda alguien, aparte del sector cárnico, ya de la noticia? ¿Han cambiado los españoles sus hábitos de consumo de estos productos, más allá de una semana después del comunicado? Definitivamente creemos que no.

8. CONCLUSIONES Y PAUTAS FUTURAS

La mayoría de las nueve consideraciones de Hill para la validez de los estudios epidemiológicos (33) no se han seguido en la evaluación de la relación causal para el consumo de carne y cualquier aspecto negativo de salud; aunque no hay un número mínimo de estas consideraciones, cuando se satisface solo una minoría de factores, la confianza en la relación independientemente causal será necesariamente baja. Es casi imposible probar un efecto nulo de cualquier componente de la dieta,

realizando siempre el mismo tipo de estudios y encontrando siempre los mismos factores de confusión. La única forma de hacer progresos en este campo es desarrollar nuevos métodos objetivos que informen de la ingesta a largo plazo del consumo de alimentos y nutrientes. Por ello, el empleo de marcadores de ingesta próxima, a medio y largo plazo es completamente fundamental, debiendo huirse de la información referida, que no siempre responde de forma totalmente fiable con lo que se ingiere. Estos marcadores además informarán de forma objetiva de los cambios que puedan producirse en la ingesta a lo largo de estudios epidemiológicos. Únicamente así, será posible relacionar de manera veraz si existe o no la relación causal entre el consumo de carne y los aspectos negativos de salud.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, y a la espera de un mayor conocimiento de las probabilidades de personalización de la dieta dependiendo de nuestra dotación génica y de la capacidad de interacción nutrigenómica y mutagenética, recomendamos:

- Disminuir la presencia de nitritos/nitratos hasta donde sea posible en los alimentos, sin que suponga una pérdida de protección frente al botulismo u otros patógenos.
- Incluir inhibidores de la nitrosación, como el ácido ascórbico y otros antioxidantes.
- Que el tratamiento térmico sea lo más suave posible evitando alcanzar temperaturas elevadas y lejanas a una práctica culinaria correcta que incrementarían el contenido de N-nitrosaminas.
- Realizar el cocinado en recipientes destapados para favorecer la disipación de las N-nitrosaminas y evitar consumir la grasa desprendida durante el cocinado.
- Recuperar la dieta mediterránea en su sentido más amplio: una base importante de productos vegetales y asegurar el consumo de los platos de cuchara (p.e. cocidos, paellas) que incluya carne y derivados cárnicos de calidad en cantidades moderadas.
- Evitar el consumo excesivo de cualquier tipo de alimento ya que este hecho reduce la variedad y calidad de la dieta. Según el Profesor Grande Covián la clave de una nutrición correcta es “Comer de todo en plato de postre”.

Es por ello, que la investigación que se realiza en distintas partes del mundo en productos cárnicos reduciendo los componentes potencialmente negativos e incorporando ingredientes funcionales que contribuyan a la mejora de su calidad y efectos saludables merece tener todo el apoyo científico e institucional.

Como muchas de las modificaciones genotóxicas y no genotóxicas del cáncer tienen lugar en etapas muy tempranas de la fase iniciación de la carcinogénesis (56, 57, 59), e incluso en etapas preneoplásicas, el tratamiento específico debe mirar a identificar estos cambios precoces en términos de expresión o actividad de moléculas implicadas. Muchos de los cambios en fases tempranas del cáncer incluyen mecanismos epigenéticos, es decir alteraciones en la expresión génica sin que se afecte la

secuencia de nucleótidos. Dado que muchos cambios epigenéticos pueden revertirse con nutrientes y compuestos bioactivos, es clara la importancia la comida en la estrategia de prevención del cáncer (55, 58). Puesto que el cáncer es una condición “crónica” que se desarrolla a lo largo del tiempo, y que ciertos tipos de cánceres tienen la fase de inicio en etapas más o menos tempranas de la vida (p.e. adolescencia) es evidente que las estrategias de prevención deben adoptarse ya en las primeras etapas de vida, con el fin de reducir el riesgo de cáncer en el adulto (56). Entre otros muchos aspectos podría incluirse que la detección temprana de niveles elevados de anti-Neu5Gc permitiría por un lado una prevención más eficaz y posteriormente una dietoterapia y farmacoterapia de precisión que ayudarían al tratamiento certero del cáncer (115).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. Food Outlook. Global Market analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2011.
2. Código Alimentario Español. Capítulos X-XI. Colección textos legales. Boletín Oficial del Estado. Madrid, 1995.
3. Farré-Rovira R, Frasquet-Pons I. Carnes y embutidos In: Guías alimentarias para la población española. Recomendaciones para una dieta saludable. Madrid: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. IM&C, S.A 2001; pp. 19-28.
4. WHO. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. Lancet Oncol 2015. Disponible en https://www.iarc.fr/en/mediacentre/pr/2015/pdfs/pr24_0_E.pdf
5. Olmedilla-Alonso B, Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. Meat Sci 2013; 95: 919-30.
6. Jiménez-Colmenero F, Selgas MD, Ansorena D. Estrategias tecnológicas y beneficios saludables de elaborados cárnicos funcionales. In: Ordoñez Pereda JA, Jiménez Colmenero FJ, Arnau Arboix J, Eds. Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables. Barcelona: Ministerio de Economía y Competitividad. Gobierno de España y Carnisenusa 2013; pp. 49-65.
7. Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos. DO L 404, 30.12.2006.
8. Selgas MD, García ML, Calvo MM. Effect of irradiation and storage on physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. Int J Food Sci Technol 2009; 44 1983-9.
9. López-López I, Cofrades S, Solas MT, Jiménez-Colmenero F. Frozen storage characteristics of low salt and reduced-fat beef patties as affected by wakame addition and replacing pork backfat with

- olive oil-in-water emulsion. *Food Res Inter* 2010; 43: 1244-54.
10. Delgado-Pando G, Cofrades S, Ruiz- Capillas C, Jiménez-Colmenero F. Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *Eur J Lipid Sci Technol* 2010; 112: 859-70.
11. Delgado-Pando G, Cofrades S, Rodríguez-Salas L, Jiménez-Colmenero F. A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Sci* 2011; 88:241-8.
12. García Iñiguez de Ciriano M, García Herreros C, Larequi E, Valencia I, Ansorena D, Astiasarán I. Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borrigo officinalis* in dry fermented sausages enriched in ω -3 PUFA. *Meat Sci* 2009; 83: 271-7.
13. Jiménez-Colmenero F, Triki M, Herrero AM, Rodríguez-Salas L, Ruiz-Capillas C. Healthy oil combination stabilized in a konjac matrix as pork fat replacement in low-fat, PUFA-enriched, dry fermented sausages. *LWT- Food Sci Technol* 2013; 51: 158-63.
14. Selgas MD, Salazar P, García ML. Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Sci* 2009; 82: 478-80.
15. Salazar MP, García ML, Selgas MD. Short-chain fructooligosaccharides as potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *Int J Food Sci Technol* 2009; 44: 1100-7.
16. Jiménez-Colmenero F, Sánchez- Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, and collaborators. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem* 2010; 123: 959-67.
17. Schultz A, González-Torres L, Olivero David R, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Wakame and Nori in restructured meat included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65: 295-8.
18. Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Méndez MT, Bastida S, Benedí J, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Glucomannan and glucomannan plus spirulina-enriched squid-surimi added to high saturated diet affect glycemia, plasma and adipose leptin and adiponectin levels in growing fa/fa rats. *Nutr Hosp* 2015; 32: 2718-24.
19. Delgado-Pando G, Celada P, Sánchez-Muniz FJ, Jiménez-Colmenero F, Olmedilla-Alonso B. Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk: a placebo-controlled study. *Eur J Nutr* 2014; 53: 83-93.
20. Informe Mercasa sobre Alimentación en España 2014. Disponible en (http://www.mercasa.es/nosotros/alimentacion_en_esp_ana).
21. Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, Eds. La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales. Madrid: Fundación Española de la Nutrición y Editec@Red S.L. 2004.
22. Dorado M, Gómez-Martín E, Jiménez-Colmenero F, Masoud T. Cholesterol and fat contents of Spanish commercial pork cuts. *Meat Sci* 1999; 51: 321-3.
23. Chizzolini R, Zanardi E, Dorigoni V, Ghidini S. Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends Food Sci Technol* 1999; 10: 119-28.
24. Delgado-Pando G. Diseño y desarrollo de productos cárnicos con perfil lipídico optimizado. Evaluación del efecto funcional en humanos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España 2012.
25. López-Bote C, Olivares A, Fernández E, Ramírez P, Rey AI. Estrategias genéticas y nutricionales en la modificación de la composición de la carne. In: Sánchez-Muniz FJ, Jiménez-Colmenero F, Olmedilla-Alonso B, Eds. Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas. Madrid: Fundación Española de Nutrición 2005; pp. 55-64.
26. Aranda-Pastor J, Quiles i Izquierdo J. Recomendaciones sobre la ingesta de proteínas en la población española. In: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), Ed. Guías Alimentarias para la Población española. Recomendaciones para una dieta saludable. Madrid: IM&C S.A. 2001, pp. 219-29.
27. MSSSI/AESAN. Evaluación nutricional de la dieta española I. Energía y macronutrientes. Sobre datos de Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición 2012a. Disponible en (http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/valoracion_nutricional_enide_macronutrientes.pdf)
28. MSSSI/AESAN. Evaluación nutricional de la dieta española II. Micronutrientes. Sobre datos de Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición 2012b. Disponible en (http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/Valoracion_nutricional_ENIDE_micronutrientes.pdf)
29. Superior Health Council. Red meat, processed red meats and the prevention of colorectal cancer 2013. Disponible en (http://health.belgium.be/internet2Prd/groups/public/@public/@shc/documents/ie2divers/19091480_en.pdf)
30. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: A global perspective

2012. Disponible en (<http://www.dietandcancerreport.org/index.php>).
31. Klurfeld DM. Research gaps in evaluating the relationship of meat and health. *Meat Sci* 2015; 109: 86-95.
32. Celada P, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. To eat or not to eat meat. That is the question. *Nutr Hosp* 2016; 33: 177-81.
33. Hill, AB. The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1965; 58: 295-300.
34. Abete I, Romaguera D, Vieira AR, López-de-Munain A, Norat T. Association between total, processed, red and white meat consumption and all-cause, CVD and IHD mortality: A meta-analysis of cohort studies. *Br J Nutr* 2014; 112: 762-75.
35. Larsson SC, Orsini N. Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2013; 179: 282-9.
36. Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(6 Suppl): 1321S-3S.
37. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization 2011.
38. Jiménez-Colmenero F, Carballo J, Cofrades S. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci* 2001; 59: 5-13.
39. WHO. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. In: Geneva: World Health Organization 2009.
40. Gesteiro E, Rodríguez-Bernal B, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Maternal diets with low healthy eating index or mediterranean diet adherence scores are associated with high cord-blood insulin levels and insulin resistance markers at birth. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 1008-15.
41. Layman DK, Clifton P, Gannon MC, Krauss RM, Nuttall FQ. Protein in optimal health: heart disease and type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1571S-5S.
42. Fogelholm M, Anderssen S, Gunnarsdottir I, Lahti-Koski M. Dietary macronutrients and food consumption as determinants of long-term weight change in adult populations: A systematic literature review. *Food Nutr Res* 2012; 56.
43. Kaluza J, Akesson A, Wolk A. Processed and unprocessed red meat consumption and risk of heart failure: Prospective study of men. *Cir Heart Fail* 2014; 7: 552-7.
44. Micha R, Michas G, Mozaffarian D. Unprocessed red and processed meats and risk of coronary artery disease and type 2 diabetes. An updated review of the evidence. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14: 515-24.
45. Roussell MA, Hill AM, Gaugler TL, West SG, Heuvel JP, Alaupovic P, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Beef in an optimal lean diet study: Effects on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 9-16.
46. Roussell MA, Hill AM, Gaugler TL, West SG, Ulbrecht JS, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Effects of a DASH-like diet containing lean beef on vascular health. *J Hum Hypertens* 2014; 28: 600-5.
47. Maki KC, Van-Elswyk ME, Alexander DD, Rains TM, Sohn EL, McNeill S. A meta-analysis of randomized controlled trials that compare the lipid effects of beef versus poultry and/or fish consumption. *J Clin Lip* 2012; 6: 352-61.
48. Sinha R, Cross AJ, Graubard BI, Leitzmann MF, Schatzkin A. Meat Intake and Mortality a prospective study of over half a million people. *Arch Int Med* 2009; 169: 562-71.
49. Ashaye A, Gaziano J, Djousse L. Red meat consumption and risk of heart failure in male physicians. *Nutr Met Card Dis* 2011; 21: 941-6.
50. Wyness L, Weichselbaum E, O'Connor A, Williams EB, Benelam B, Riley H, Stanner S. Red meat in the diet: an update. *Nutr Bull* 2011; 36: 34-77.
51. Mente A, de Koning L, Shannon HS, Anand SS. A Systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Int Med* 2009; 169: 659-69.
52. García-Quismondo A. Proteína C reactiva, índice de conicidad y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid 2016.
53. Aune D, Ursin G, Veierod MB. Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* 2009; 52: 2277-87.
54. Pan A, Sun Q, Bernstein AM, Schulze MB, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 1088-96.
55. Flores Balcázar CD. Cáncer: regulación molecular con componentes dietéticos. In: Gordillo Bastidas D, Gordillo Bastidas E, Eds. *Nutrición molecular*. México: McGraw Hill education 2015; pp. 307-328.
56. Muriana FJG. Efectos anticancerígenos de los ácidos grasos omega-3 y oleico. In: Mataix J, Gil A, Eds. *Libro blanco de los omega-3*. Granada: Puleva Food 2002; pp. 112-25.
57. Vargas Morales AM, Sola Zapata MM. Sevillano Tripero L. Proliferación y muerte celular. In: Gil A, Ed. *Tratado de nutrición*. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 2010; pp. 806-34.
58. Ocegüera Contreras, Gordillo Bastidas D. Regulación del ciclo celular: nutrimentos como moduladores. In: Gordillo Bastidas D, Gordillo Bastidas E, Eds. *Nutrición molecular*. México: McGraw Hill education 2015; pp. 85-99.
59. Ramírez Tortosa MC, Cambor Álvarez M, García Peris P. Nutrición y cáncer. In: Gil A. Ed. *Tratado de*

- nutrición. Tomo IV. Nutrición Clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 2010; pp. 547-65.
60. Naguib A, Mitrou PN, Gay LJ, Cooke JC, Luben RN, Ball RY, McTaggart A, Arends MJ, Rodwell SA. Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with BRAF and K-ras mutations arising in distinct subsets of colorectal cancers in the EPIC Norfolk study. *BMC Cancer* 2010; 10: 99.
61. WCRF/AICR. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research 2007.
62. WCRF/AICR. The associations between food, nutrition and physical activity and the risk of colorectal cancer. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research 2010.
63. Ferguson LR. Meat and cancer. *Meat Sci* 2010; 84: 308-13.
64. McAfee AJ, McSorley EM, Cuskelly GJ, Moss BW, Wallace JMW, Bonham MP, Fearon AM. Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Sci* 2010; 84: 1-13.
65. Alexander DD, Weed DL, Cushing CA, Lowe KA. Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 2011; 20: 293-307.
66. Spencer EA, Key TJ, Appleby PN, Dahm CC, Keogh RH, Fentiman IS, Akbaraly T, Brunner EJ, Burley V, Cade JE, Greenwood DC, Stephen AM, Mishra G, Kuh D, Luben R, Mulligan AA, Khaw KT, Rodwell SA. Meat, poultry and fish and risk of colorectal cancer: pooled analysis of data from the UK dietary cohort consortium. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 1417-25.
67. Boyle P, Boffetta P, Autier P. Diet, nutrition and cancer: public, media and scientific confusion. *Ann Oncol* 2008; 19: 1665-7.
68. Marshall CJ. Small GTPases and cell cycle regulation. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 363-70.
69. Zamora S. Consumo de carne roja y salud. Editorial SEN, Enero 2016.
70. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer* 2009; 125: 171-80.
71. Alexander DD, Weed DL, Cushing CA, Lowe KA. Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 2011; 20: 293-307.
72. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PloS One* 2011; 6: e20456.
73. Carr PR, Walter V, Brenner H, Hoffmeister M. Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2016; 138: 293-302.
74. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2006; 119: 2657-64.
75. Schut HA, Snyderwine EG. DNA adducts of mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20: 353-68.
76. Sinha R, Rothman N. Exposure assessment of heterocyclic amines (HCAs) in epidemiologic studies. *Mutat Res* 1997; 376 (1-2): 195-202.
77. Alaejos MS, González V, Afonso AM. Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: A review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008; 25: 2-24.
78. Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44: 44-55.
79. Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Koop-Schneider A, Roots I, Bartsch H. Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphism. *Carcinogenesis* 2000; 21: 35-41.
80. Ordóñez Pereda JA, Anadón Navarro A, Arboix Arzo M, Centrich F, Juárez M, Palou A, Suárez L, Blanch AI, Marín MT. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN, en relación con el riesgo de la posible presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura. *Revista del Comité Científico de la AESAN. AESAN* 2007-007. 2008; 8: 9-40.
81. Scientific Panel of Contaminants in the food chain on a request from the European Commission to perform a scientific risk assessment on nitrite in vegetable. *EFSA J* 2008; 689; 1-79.
82. Directiva 95/2/ce del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes 1995.
83. Roberts TA. The microbiological role of nitrite and nitrate. *J Sci Food Agric* 1975; 26: 1755-60.
84. Hyytiä E, Eerola S, Hielm S, Korkeala H. Sodium nitrite and potassium nitrate in control of nonproteolytic *Clostridium botulinum* outgrowth and toxigenesis in vacuum-packed cold-smoked rainbow trout. *Int J Food Microbiol* 1997; 37: 63-72.
85. Buchanan RL, Solberg M. Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci* 1972; 37: 81-5.
86. O'Leary DF, Solberg M. Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol group and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31: 208-12.

87. Nychas GJE, Arkoudelos JS. Staphylococci: their role in fermented sausages. *J Appl Bacteriol Sympos* 1990; Suppl, 19: 167S-88S.
88. Brooks J, Hainer RB, Morgan T, Pace J. The function of nitrate, nitrite and bacteria in the curing of bacon and hams. *Food Investigation Special Report No. 49*. London: His Majesty's Stationary Office 1940.
89. Leistner L. The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. In: Smulders FJM, Toldrá F, Flores F, Prieto MN, Eds. *New technologies for meat and meat products*. Nijmegen: Eceamst Audet 1992; pp. 1-19.
90. Akintonwa DA. Theoretical mechanistic basis of oxidants of methaemoglobin formation. *Med Hypotheses* 2000; 54: 312-20.
91. Hernández Rodríguez M, Ed. *Alimentación infantil*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos 2001.
92. Habermeyer M, Roth A, Guth S, Diel P, Engel KH, Epe B, Fürst P, Heinz V, Humpf HU, Joost HG, Knorr D, de Kok T, Kulling S, Lampen A, Marko D, Rechkemmer G, Rietjens I, Stadler RH, Vieths S, Vogel R, Steinberg P, Eisenbrand G. Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 106-28.
93. Walters, C.L. Reaction of nitrates and nitrites in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. *Food Addit Contam* 1992; 9: 441-7.
94. Gray JI, Irvine DM, Kakuda Y. Nitrates and N-nitrosamines in cheese. *J Food Prot* 1979; 42: 263-72.
95. Chow CK, Hong CB. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology* 2002; 180: 195-207.
96. Boyland E, Nice E, Williams K. The catalysis of nitrosation by thiocyanate from saliva. *Food Cosmet Toxicol* 1971; 9: 639-43.
97. Hildrim KI, Scanlan RA, Libbey LM. Identification of gamma-nutenyl-(beta-propenyl) nitrosamine, the principal volatile nitrosamine formed in the nitrosation of spermidin or spermin. *J Agric Food Chem* 1975; 23: 34-7.
98. Bastide NM, Pierre F, H, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 177-84.
99. Samraj AN, Läubli H, Varki N, Varki A. Involvement of a non-human sialic acid in human cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 33.
100. Ródenas S, Bastida S, Sevillano MI, Larrea Marín MT, Sánchez-Muniz FJ, González-Muñoz MJ. Blood pressure of omnivore and semi-vegetarian postmenopausal women and their relationship with dietary and hair essential and toxic metals. *Nutr Hosp* 2011; 26: 874-83.
101. Schinca N, Salvador G. Dietas alternativas. In: *Sociedad Española de Nutrición comunitaria (SENC)*, Eds. *Guías alimentarias para la población española*. Recomendaciones para una dieta saludable. Madrid: IM&C, S.A. 2001; pp. 463-73.
102. Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, Fan J, Sveen L, Bennett H, Knutsen SF, Beeson WL, Jaceldo-Siegl K, Butler TL, Herring RP, Fraser GE. Vegetarian dietary patterns and the risk of colorectal cancers. *JAMA Intern Med* 2015; 175: 767-76.
103. Preedy VR, Watson RR. *The Mediterranean Diet. An Evidence-Based Elsevier*. Amsterdam, 2015.
104. Kontou N. The mediterranean diet in cancer prevention. In: Preedy VR, Watson RR, Eds. *The mediterranean diet: an evidence-based approach*. Amsterdam: Elsevier 2015; pp. 393-405.
105. González CA, Buckland G. The mediterranean diet and gastric cancer. In: Preedy VR, Watson RR, Eds. *The mediterranean diet. An evidence-based approach*. Amsterdam: Elsevier 2015; pp. 417-23.
106. Serra-Majem L, Medina FX. The Mediterranean diet as an intangible and sustainable food culture. In: Preedy VR, Watson RR, Eds. *The Mediterranean diet. An evidence-based approach*. Amsterdam: Elsevier 2015; pp. 37-46.
107. Sánchez-Muniz FJ. Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *An R Acad Nac Farm* 2007; 73: 653-92.
108. Pirámide vegana. Disponible en (<https://www.google.es/search?q=dieta+vegana&newwindow=1&tbm=isch&imgil=CgaQ9U5p-Wws9M%253A%253BX2MXs4Y0ORH29M%253Bhttps%25253A%25252F%25252Fwww.shbarcelona.es%25252Fblog%25252F>).
109. Fernández de Aguirre Malina M, Díaz Ereño E. Alimentación y cáncer. In: *Sociedad Española de Nutrición comunitaria (SENC)*, Eds. *Guías alimentarias para la población española*. Recomendaciones para una dieta saludable. Madrid: IM&C 2001; pp. 423-37.
110. Zarzuelo Zurita A, Gávez Peralta J. Fibra dietética. In: Gil A, Ed. *Tratado de nutrición*. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 2010; pp. 233-56.
111. Steelman VM. Creutzfeld-Jacob disease: recommendations for infection control. *Am J Infect Control* 1994; 22: 312-8.
112. http://www.abc.es/sociedad/abci-doctor-estruch-habria-cuidar-alimentacion-antes-recurrir-farmacos-201511011704_noticia.html
113. García-Diz L. Calidad de vida y epidemiología de las enfermedades asociadas al consumo de cárnicos. In: Sánchez-Muniz FJ, Jiménez-Colmenero F, Olmedilla-Alonso B, Eds. *Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas*. Madrid: Fundación Española de Nutrición 2005; pp. 33-42.
114. Arteaga M. Percepción del consumidor. Claves de la comunicación. In: Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, Eds. *La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales*. Madrid:

- Fundación Española de la Nutrición y Editec@Red S.L. 2004; pp. 111-6.
115. Padler-Karavani V. Aiming at the sweet side of cancer: Aberrant glycosylation as possible target for personalized-medicine. *Cancer Lett* 2014; 352:102-12.



Microcalorimetry contributions to early diagnosis of bacterial infections

Title in Spanish: *Aportaciones de la microcalorimetría al diagnóstico precoz de infecciones bacteriana*

Natividad Lago Rivero¹, Isaac G. Arias Santos², José L. Legido Soto³, Cristina Vázquez Gómez³

¹Servicio de Farmacia. Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (Hospital Álvaro Cunqueiro). C/Camiño dos cañotais nº 44, Vigo (Pontevedra). ²Académico Numerario de la Academia de Farmacia de Galicia. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. ³Departamento de Física Aplicada. Facultad de Ciencias. Campus Universitario de Vigo (Lagoas Marcosende), 36310, Vigo (Pontevedra)

ABSTRACT: Microcalorimetry is a highly sensitive experimental technique that determines heat changes in any process or transformation. All organisms produce heat due to their metabolism. Rate of heat flow is an adequate measure of metabolic activity of living beings and their component parts. Microorganisms produce small amounts of heat: 1-3 pW per cell. Although the heat produced by bacteria is very small, their exponential reproduction in a culture medium permits heat detection through microcalorimetry. A thermal conductivity calorimeter of the Calvet type was used. The inside of the calorimeter contains two stainless steel cells (experimental and reference) with a screw on Teflon cap with a hole in the centre. Experiments were carried out with final concentrations of the order of 10^6 , 10^5 , 10^3 and 10 UFC/ml. These were kept at a constant temperature of 309.65 K. The plot of change in heat voltage vs. time enables us to obtain the characteristic growth curve for each bacterial strain. Thermograms were analyzed mathematically allowing us to calculate the constant growth, generation time and the amount of heat exchanged over the culture time.

RESUMEN: La microcalorimetría es una técnica experimental que permite determinar con alta sensibilidad la energía expuesta como consecuencia de cualquier proceso o transformación. Todos los organismos producen calor debido a su metabolismo. La tasa de calor es una medida adecuada de la actividad metabólica de los organismos y sus partes constituyentes. Los microorganismos producen pequeñas cantidades de calor, del orden de 1-3 pW por célula. A pesar de la baja cantidad de calor producido por las bacterias, su exponencial replicación en un medio de cultivo permite su detección mediante microcalorimetría. Se ha utilizado un calorímetro de conducción calorífica tipo Calvet, en cuyo recinto interior se sitúan dos células (experimental y testigo) de acero inoxidable con tapón roscado de teflón perforado en el centro. Las experiencias se llevaron a cabo a concentraciones finales de 10^6 , 10^5 , 10^3 y 10 UFC/ml y se mantuvo una temperatura constante de 309,65 K. La representación de la diferencia de potencial calorífico frente al tiempo permite obtener las curvas de crecimiento características de cada bacteria. Los termogramas se analizaron matemáticamente permitiendo calcular la constante de crecimiento, el tiempo de generación y la cantidad de calor intercambiado.

*Corresponding Author: natividad.lago.rivero@sergas.es

Received: November 10, 2015 Accepted: Mars 10, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 1 (2016), pp. 91-96

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde las primeras horas de vida, los seres humanos son colonizados por microorganismos, y algunos de ellos vivirán en simbiosis permanente con su huésped en la piel, tracto digestivo, vías respiratorias altas y otros muchos tejidos, constituyendo la flora microbiana normal. Algunos participan en procesos bioquímicos fundamentales para la vida de los seres humanos. Por lo tanto, se establece un equilibrio que se puede ver alterado en determinadas situaciones produciéndose lo que conocemos como infección.

Actualmente, disponemos de una amplia variedad de antibióticos, pero para optimizar su uso, es necesario un método de diagnóstico precoz, que nos permita un inicio temprano del tratamiento, ajustado a las sensibilidades del microorganismo causante y en las condiciones óptimas.

Para los microorganismos, el crecimiento es una respuesta esencial al ambiente fisicoquímico al cual están sujetos. Las bacterias pueden crecer bajo una variedad de condiciones físicas, químicas y nutricionales muy diversas.

El metabolismo es el conjunto total de reacciones químicas que tienen lugar en la célula, y es posible gracias al flujo de energía y a la participación de enzimas.

Las variaciones de calor que se producen como consecuencia de las reacciones químicas que tienen lugar durante el metabolismo, pueden ser empleadas para monitorizar el crecimiento bacteriano.

La tasa de calor es una medida adecuada de la actividad metabólica de los organismos y sus partes constituyentes, células y niveles subcelulares (1). El calor generado por una sola célula está en el rango de 1-80 pW. Células humanas de tejidos conectivos (fibroblastos,

adipocitos...) han reportado tasas metabólicas de aproximadamente 25-80 pW por célula. En contraste, los microorganismos producen pequeñas cantidades de calor, del orden de 1-3 pW por célula. A pesar de la baja cantidad de calor de las bacterias, su replicación exponencial en medios de cultivo permite su detección por microcalorimetría en pocas horas, incluso partiendo de muestras con una baja concentración de bacterias (10 UFC/ml).

La microcalorimetría es una técnica experimental que permite determinar, con alta sensibilidad, la energía expuesta como consecuencia de cualquier proceso o transformación (3,4), lo que la convierte en un método de detección precoz para determinar el crecimiento bacteriano, a partir de la energía intercambiada en su metabolismo (5). Esta técnica se ha utilizado para estudiar el crecimiento y metabolismo de los microorganismos en diferentes condiciones (6-10).

El análisis microcalorimétrico de las especies bacterianas, nos permite conocer a tiempo real las curvas de crecimiento de los diferentes microorganismos. A partir de estos termogramas se puede extraer el valor de parámetros propios de cada bacteria (constante de crecimiento, tiempo de generación, cantidad de calor intercambiado...). Esta técnica permite determinar la presencia de bacterias en menos de 10 horas, incluso partiendo de cultivos con una baja densidad bacteriana (10 UFC/ml), e identificar la especie bacteriana en las primeras 24 horas de cultivo (10).

Los estudios microcalorimétricos también permiten conocer la evolución del metabolismo bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico y determinar la concentración mínima inhibitoria (11,12).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de la muestra

Hemos partido de hemos partido de cultivos puros de cepas de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Las muestras las muestras se siembran en una placa de agar sangre (bioMérieux®) e incubadas a 310,15 K en una estufa durante 24 horas. A partir de la placa de agar sangre donde han crecido múltiples colonias, preparamos una suspensión de bacterias en fisiológico 0.9%, cuya concentración es ajustada a la correspondiente a 0.5 de la escala McFarland. A partir de esta solución, se hacen las diluciones con fisiológico 0.9% que permitan concentraciones finales de 10^6 , 10^5 , 10^3 o 10 UFC/ml (8, 10).

Las operaciones anteriores son realizadas en la proximidad de un mechero, con la intención de conseguir la esterilidad del proceso.

Como medio de cultivo hemos utilizado un medio líquido de soja-caseína digerida (BACTEC® tipo PEDS PLUS/F).

2.2. Equipo experimental

Las medidas se llevaron a cabo utilizando un microcalorímetro tipo Calvet (13), equipado con un dispositivo que permite el funcionamiento en ausencia de fase de vapor, y que dispone de dos células de aluminio y teflón con una capacidad de 10 ml. Además, cuenta con un multímetro Philips PM2535 y un sistema de adquisición de datos vinculados al microcalorímetro (Fig. 1). El calibrado se realizó eléctricamente utilizando como fuente de corriente constante un EJP30 Setaram. Detalles más concretos del método experimental han sido publicados por la Profesora Paz Andrade (14).

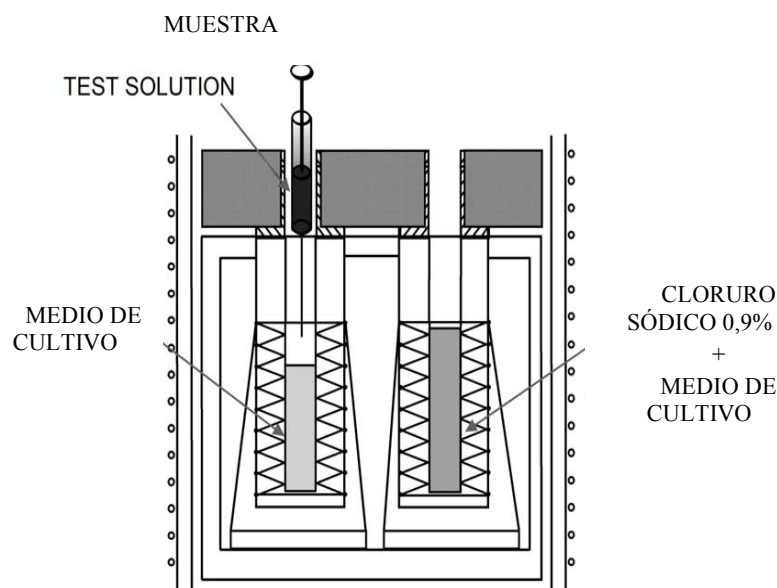


Figura 1. Montaje experimental

2.3. Montaje experimental y recogida de datos

En el recinto externo del calorímetro se ha mantenido una temperatura constante de 309,65 K. En la célula testigo se incorporan 7 ml de medio de cultivo más 1ml de suero fisiológico, y en la experimental 7ml de medio de cultivo. Ambas células se introducen a través de dos orificios cilíndricos, paralelos entre sí, que van desde la parte superior del microcalorímetro hasta el recinto interno de las termopilas. La gran distancia que separa las células de la entrada, permite minimizar los efectos de conducción calorífica hacia el exterior. El sistema se deja estabilizar durante aproximadamente dos horas, momento en el que se introduce en la célula experimental 1ml de la concentración establecida.

La experiencia también se ha realizado con una muestra sin bacterias (control).

Los datos son recogidos por el sistema de adquisición y tratamiento de datos, a intervalos de 15 segundos durante el tiempo que dure la experiencia. La precisión en la señal calorimétrica es de un 1 μ V.

3. RESULTADOS

Representando la diferencia de potencia calorífica generada entre las células experimental y testigo frente al tiempo, obtenemos las gráficas de crecimiento de las bacterias. En ellas se pueden identificar las diferentes fases de crecimiento bacteriano: latencia, exponencial, mantenimiento y muerte celular.

Las curvas obtenidas presentan una forma característica que se repite para cada bacteria a todas las concentraciones estudiadas, comportándose como una huella térmica. En las figuras 2-4, podemos observar el comportamiento térmico de las enterobacterias *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae* a diferentes concentraciones (15).

Como podemos observar en las gráficas, existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño del inóculo y el tiempo hasta la detección de la señal, siendo este menor a medida que aumentamos la concentración del cultivo. En cualquier caso, incluso para concentraciones bajas (10 UFC/ml) antes de 8 horas podemos identificar crecimiento bacteriano en la muestra. La aparición de los picos máximos sigue un orden relativo a la concentración, y aunque a altas concentraciones los picos son más intensos, no se puede establecer una relación de proporcionalidad.

En los termogramas de las enterobacterias estudiadas se observan diferencias y similitudes que podrían responder al tipo de fermentación de la glucosa; *E. coli* y *P. mirabilis* presentan una fermentación ácido-mixta, mientras que *K. pneumoniae* se caracteriza por presentar una fermentación butanodiolica.

En el caso de *E. coli* y *P. mirabilis* se manifiestan dos fases metabólicas, la primera de mayor energía y menor duración, seguida por un periodo de latencia que precede a un segundo periodo de menor potencia pero que se prolonga en el tiempo. La principal diferencia entre los

perfiles de estas bacterias es el tiempo que separa los dos picos de flujo, ya que se observa que este periodo es mayor en las muestras de *E. coli*. En el caso de *P. mirabilis*, tras el primer pico característico de todos los termogramas, y antes del primer pico de máximo voltaje, se describe una zona en la que no llega a manifestarse un vértice, pero que se ha ajustado a una ecuación de tipo polinómico y de la que hemos podido extraer un punto de inflexión.

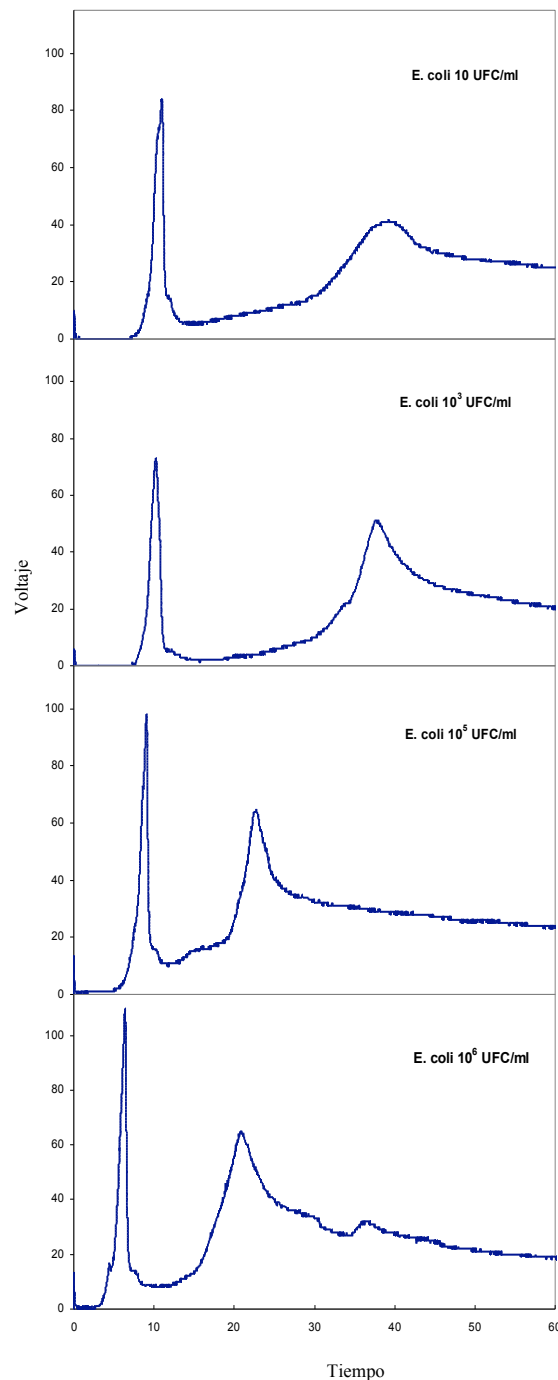


Figura 2. Termogramas de *E. coli* (μ V $\rightarrow$ t (horas)).

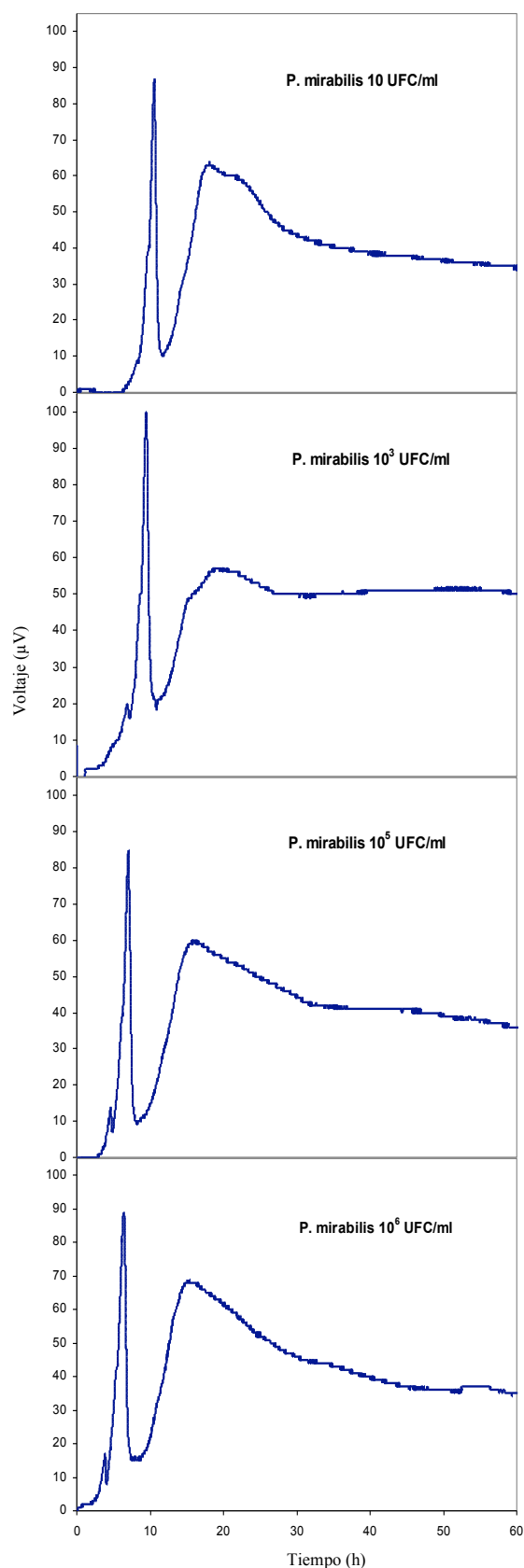


Figura 3. Termogramas de *P. mirabilis* ($\mu\text{V} \rightarrow t$ (horas)).

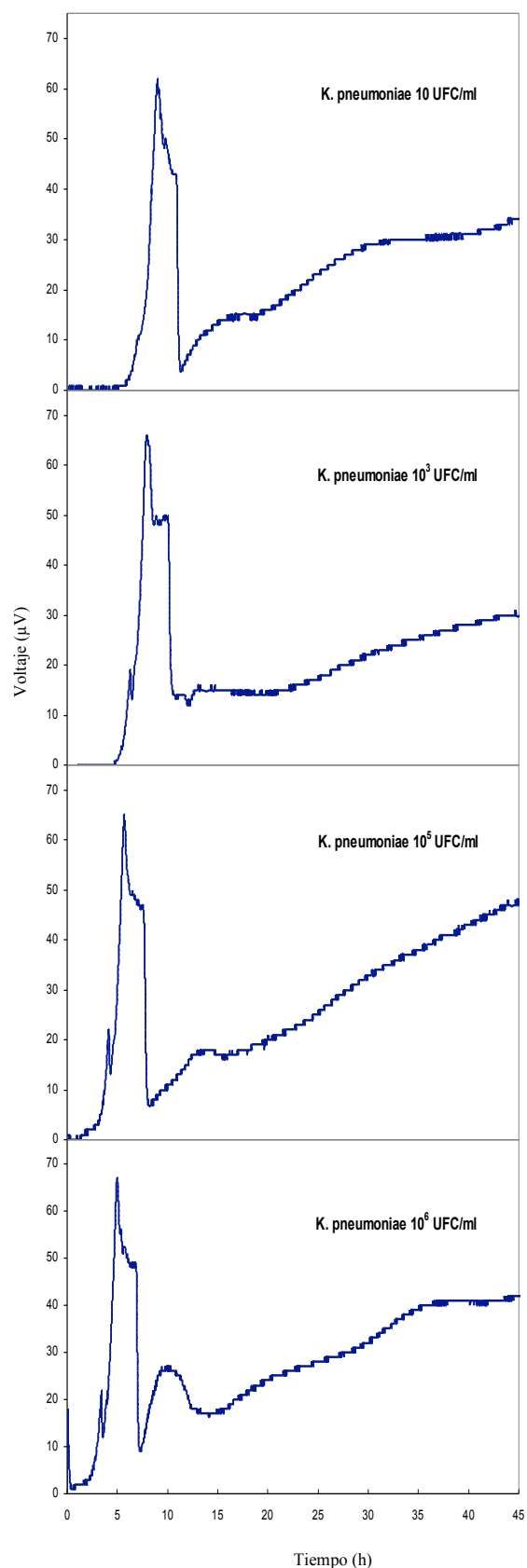


Figura 4. Termogramas de *K. pneumoniae* ($\mu\text{V} \rightarrow t$ (horas)).

En cuanto al termograma de *K. pneumoniae*, es claramente diferente al de las otras enterobacterias comentadas. En este caso se observa una primera fase característica, en la cual tras el pico máximo se traza una meseta previa a un descenso brusco hasta niveles muy bajos, del orden de 10 μV . Tras este punto se percibe un incremento exponencial del flujo de calor, sin llegar a un pico máximo durante el tiempo que dura la experiencia.

Los resultados obtenidos han sido tratados matemáticamente, ajustándose a ecuaciones de tipo exponencial y polinómico. En la fase logarítmica de la curva de crecimiento los datos obtenidos se han ajustado a una ecuación exponencial. En esta fase de la curva de crecimiento, la proliferación microbiana se puede expresar como:

$$n_t = n_0 \times \exp(k \times t) \quad (1.1)$$

donde n_0 es el número de células a tiempo 0, y n_t el número de células a tiempo t y k es la constante de crecimiento (16).

Si consideramos P_w como la energía desprendida por cada célula, entonces:

$$n_t P_w = n_0 \times P_w \times \exp(k \times t) \quad (1.2)$$

Teniendo en cuenta que la energía desprendida a t cero es P_0 y P_t a tiempo t :

$$P_t = P_0 \times \exp(k \times t) \quad (1.3)$$

$$\ln P_t = \ln P_0 + k \times t \quad (1.4)$$

Se define tiempo de generación (G) como el tiempo que tarda una población en duplicar su número, y se expresa como:

$$G = \frac{(\ln 2)}{k} \quad (1.5)$$

Por lo tanto, a partir del ajuste matemático de los valores de potencia obtenidos en el estudio microcalorimétrico de cultivos bacterianos podemos extraer de forma rápida y sencilla el valor de la constante de crecimiento y del tiempo de generación de la bacteria objeto de estudio.

Del termograma también podemos extraer la cantidad de calor (Q) intercambiado durante el tiempo que dura la experiencia.

$$Q = K \cdot A \quad (1.6)$$

Donde, A ($\mu\text{V} \cdot \text{h}$) representa el área, calculada por el método trapezoidal, y K es una constante cuyo valor 24,8 J/ $\mu\text{V} \cdot \text{h}$ fue calculada a partir del calibrado eléctrico realizado por efecto Joule del equipo.

4. DISCUSIÓN

Cada persona está colonizada por un número de células bacterianas superior al número de células que forman parte del organismo. Normalmente, se establece una relación simbiótica entre la bacteria y el hospedador, aunque en ocasiones este equilibrio se rompe produciéndose una

infección. A pesar del amplio arsenal terapéutico disponible, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. En este sentido es determinante un método de diagnóstico precoz que permita un inicio temprano del tratamiento antibiótico ajustado a las sensibilidades del agente causal.

La microcalorimetría es una técnica analítica de medida del calor producido o consumido por reacciones químicas o cambios físicos de estado, incluyendo el calor intercambiado durante los complejos procesos biológicos. Ha sido usada en biología, farmacología, biotecnología y ecología por su alta sensibilidad, precisión y simplicidad, sin embargo, el uso en clínica ha sido muy limitado (6,17).

La microcalorimetría permite determinar la presencia de microorganismos en la muestra en pocas horas, ya que aunque el inóculo inicial presente una baja concentración de bacterias, su exponencial replicación hace posible medir el calor generado como consecuencia de su metabolismo. Esta información tiene una gran relevancia desde el punto de vista clínico, ya que como podemos ver en los termogramas obtenidos en este trabajo, es posible identificar la presencia de enterobacterias en una muestra en menos de 8 horas, incluso en las muestras menos concentradas (10 UFC/ml).

Además, teniendo en cuenta las experiencias realizadas, podemos decir que en un medio de cultivo definido cada especie analizada presenta un perfil de crecimiento que se repite a todas las concentraciones estudiadas, obteniendo una “huella térmica” de cada bacteria, e incluso permitiendo diferenciar especies del mismo género (11). Esta curva calorimétrica está definida por una serie de puntos de fuerza electromotriz registrados por el sistema de adquisición de datos, y que responden al intercambio energético que se produce durante el periodo de cultivo, permitiendo la identificación de la especie bacteriana.

En los termogramas se registran una serie de picos de energía que posiblemente estén asociados a la capacidad que tiene cada microorganismo de asimilar los diferentes componentes del medio de cultivo. Cabe destacar las similitudes observadas entre los termogramas de *E. coli* y *P. mirabilis*, dos especies que presentan el mismo tipo de fermentación de la glucosa, ácido-mixta, mientras que *K. pneumoniae* caracterizada por una fermentación butanodiolica muestra un termograma radicalmente diferente.

Los resultados obtenidos han sido tratados matemáticamente, permitiendo conocer de forma rápida y sencilla el valor de la constante de crecimiento (K) y el tiempo de generación (G), parámetros característicos de cada especie bacteriana y que para conocerlos por los métodos habituales se requieren técnicas muy laboriosas. Además, la microcalorimetría permite cuantificar la cantidad de calor intercambiado (Q) en un cultivo bacteriano durante un periodo definido. El conocimiento de estos parámetros abre las posibilidades de nuevos estudios, que permitan conocer el comportamiento de una

especie bacteriana en presencia de diferentes sustancias, por ejemplo antibióticos, contribuyendo al conocimiento de las sensibilidades de los microorganismos a las diferentes opciones terapéuticas.

5. CONCLUSIONES

La microcalorimetría ha demostrado ser una técnica muy útil y eficiente en la detección precoz de bacterias en un medio de cultivo. Permite detectar y cuantificar muy pequeñas cantidades de energía intercambiada y en consecuencia detectar crecimientos bacterianos, aun con muy pequeños inóculos, 10 UFC/ml, en pocas horas.

Las curvas calorimétricas obtenidas permiten caracterizar cualitativamente la bacteria estudiada, haciendo posible la identificación de la especie en las primeras 24 horas de cultivo.

Por lo tanto, la microcalorimetría se presenta como una técnica capaz de determinar el agente causal de la infección en menos de 24 horas horas, consiguiendo un diagnóstico precoz que permita un inicio temprano del tratamiento. Además, esta técnica abre las posibilidades de nuevos estudios que nos acerquen a un mayor conocimiento del comportamiento de las bacterias en presencia de determinadas sustancias.

6. REFERENCIAS

1. Trampuz A, Salzmann S, Antheaume J, Daniela, AU. Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion* 2007; 47: 1643-50.
2. Calvet E, Prat H. Récents progrès in microcalorimétrie. Paris: Dunod 1958.
3. Paz Andrade MI. Les Développements Récents de la Microcalorimétrie et de la Thermogenese, 1st Ed. Paris: CRNS 1967.
4. Braissant O, Wirz D, Göpfert B, Daniela U. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiology letters* 2010; 303: 1-8.
5. Rodríguez BV, Contreras R, Almora E. Estudio microcalorimétrico del crecimiento de dos especies de micoplasma. *Interferón y Biotecnología* 1989; 6, 2: 191-5.
6. Thomas M, Wolfgang B. Theromokinetic description of anaerobic growth of *Halomonas halodenitrificans* using a static microcalorimetric ampoule technique. *Journal of Biotechnology* 2003; 101: 267-74.
7. Ma J, Qi WT, Yang LN, Yu WT, Xie YB, Wang W. Microcalorimetric study on the growth and metabolism of microencapsulated microbial cell culture. *Journal for Microbiological Methods* 2007; 68: 172-7.
8. Lago N, Legido JL, Arias I, García F. Aplicaciones de la microcalorimetría como método de identificación precoz del crecimiento bacteriano. *Investigación, cultura, ciencia y tecnología* 2010; 2, 3: 6-9.
9. Lago_a N, Legido JL, Paz-Andrade MI, Arias I, Casás LM. Microcalorimetric study on the growth and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2011; 105: 651-5.
10. Lago N, Legido JL, Arias I, Casás L. Microcalorimetric study of the growth of *Enterococcus faecalis* in an enriched culture medium. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2012; 108, 2: 665-70.
11. Von Ah U, Dieter W, Daniels AU. Rapid differentiation of Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Methicillin-Resistant *S. aureus* and MIC Determinations by Isothermal Microcalorimetry. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46, 6: 2083-7.
12. Von Ah U, Dieter W, Daniels AU. Isothermal microcalorimetry –a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and referente strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiology* 2009; 9: 106.
13. Calvet E, Prat H. Microcalorimétrie: Applications physico-chimiques et biologiques. Paris: Masson et C^{ie} 1956.
14. Paz Andrade MI. Les Développements Récents de la Microcalorimétrie et de la Thermogenese, 1st Ed. Paris: CRNS 1967.
15. Lago N, Legido JL, Arias I, Casás L. Comparative study of microcalorimetric behavior of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology* 2012; 61, 4: 165-8.
16. Ma J et al. Microcalorimetric study on the growth and metabolism of microencapsulated microbial cell culture. *Journal for Microbiological Methods* 2007; 68: 172-7.
17. Baldoni D et al. Performance of Microcalorimetry for Early Detection of Methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47, 3: 774-6.



Gomis, Alberto; Bernardo, Ángeles. *La Farmacia en el distrito de Piedrahíta en los primeros años de la colegiación obligatoria (1898-1931)*. [Monografías Humanidades, 50]. Alcalá de Henares: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, 2014. 355 págs. ISBN: 978-84-16133-23-9.

Antonio González Bueno¹

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

Corresponding author: agbueno@ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 1 (2016), pp. 97-98

Received: December 29, 2015 Accepted: April 15, 2016

Language of Manuscript: Spanish

La localización, en una colección privada, del *Libro de Actas de las Juntas de Distrito de Piedrahíta, sucursal del Colegio de Farmacéuticos de Ávila*, correspondiente al período 1918-1931 y un conjunto de documentación correlacionada con este volumen, fue el hito determinante para que los profesores Alberto Gomis y Ángeles Bernardo se lanzaran al estudio del ejercicio de la profesión farmacéutica en este partido judicial.

La fuente principal fue completada con el estudio exhaustivo del *Boletín Oficial de la Provincia de Ávila* y el análisis de documentación conservada en los archivos de la Real Academia Nacional de Farmacia (Madrid), General de la Administración (Alcalá de Henares), Histórico Nacional (Madrid), Ayuntamiento de Piedrahíta, Centro Documental de la Memoria Histórica (Salamanca), Instituto 'Brianda de Mendoza' (Guadalajara) y Universidad de Santiago de Compostela. Se unen a éstas un buen cúmulo de información procedente de la prensa profesional: *El Monitor de la Farmacia*, *El Restaurador Farmacéutico*, *La Farmacia Española*, *La Farmacia Moderna*, *La Voz de la Farmacia*. Y algunos anuarios, tal el *Curiel médico-farmacéutico*, el *Riera general y exclusivo de España*, el *Almanaque del Comercio, de la Industria, de la Magistratura y de la Administración* o el *Anuario Médico de España*.

El resultado es un magnífico y bien construido modelo que nos permite conocer, más allá de lo que trasciende del análisis de las fuentes oficiales, el discurrir real y cotidiano de un grupo de farmacéuticos rurales, con problemas diferentes a los que se constatan desde las grandes ciudades y con soluciones, a escala local, que definen la idiosincrasia de esta actividad profesional: el proceloso mundo de las iguales, las dotaciones de instrumental de las boticas rurales, el trabajo del farmacéutico titular (transformado luego en inspector municipal), los derechos de huérfanos y viudas, el rol del farmacéutico regente, las obligaciones fiscales, la actuación del farmacéutico ante las epidemias y el progresivo cambio en la profesión que lleva a la introducción de los medicamentos de fabricación industrial a la par que a la presencia de la mujer, licenciada en farmacia, en el ejercicio profesional rural. A la par que nos muestra la angustiosa situación de un profesional universitario recluido en un entorno rural, cuya actividad intelectual queda reducida, las más de las veces, a la lectura de la prensa política y profesional y a las charlas de rebotica, cuando éstas tienen lugar.

El período elegido por Alberto Gomis y Ángeles Bernardo viene condicionado por la disponibilidad de la fuente, pero transcurre entre la publicación de los Estatutos para el régimen de los Colegios profesionales de médicos y farmacéutico (15/04/1898) y el inicio de la II República española (14/04/1931).

Los autores abordan su trabajo desde tres grandes bloques: el primero está dedicado al análisis del proceso de colegiación en la provincia de Ávila: desde los problemas relativos a la configuración de los distritos farmacéuticos al estudio del funcionamiento interno de la Junta del Distrito de Piedrahíta; en el segundo se aborda, municipio a municipio, hasta un total de 71 localidades, la existencia de farmacia en cada uno de ellos, las características del establecimiento y la sucesión de sus propietarios; el tercer bloque proporciona una biografía de cada uno de los profesionales que ejercieron en este distrito: cuarenta farmacéuticos de los que apenas teníamos datos de su existencia y que ahora han pasado a formar parte de la historia de la profesión.

Como parte introductoria a su trabajo, Alberto Gomis y Ángeles Bernardo realizan una sinopsis histórica de la farmacia y farmacéuticos abulenses que traspasa, con mucho, la mera erudición bibliográfica; así, por ejemplo, el estudio de documentación de archivo les permite aportar nuevos datos biográficos sobre Agustín José de Mestre (1770-1836) y Manuel Hernández de Gregorio (1771-1833).

El texto, en el que también cobran presencia las fuentes orales, se completa con una magnífica selección de 107 figuras,

en las que tienen cabida desde retratos a documentos, muebles, instrumentos y restos arquitectónicos, lo que, además de ponderar el trabajo de campo realizado, constituye un ‘museo virtual’ de historia de la farmacia del área estudiada.

En definitiva, una historia social de la profesión farmacéutica, realizada con un gran cuidado y un profundo conocimiento de las fuentes, un trabajo de fina y elegante composición, destinado a convertirse en referente para quienes quieran abordar este tipo de estudios locales, y en obra de consulta obligada para quienes quieran conocer la ‘pequeña historia’, la ‘historia periférica’, del ejercicio profesional, en un período crucial para el desarrollo de la Farmacia en nuestro país.



Sesión Inaugural del Curso Académico 2016

Orden del Día

1. Salutación del Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.
2. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2015 por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas.
3. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor Don Benito del Castillo García, Académico de Número, titulado «*Huella farmacéutica española en Filipinas*».
4. Entrega de una Placa de Honor al Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento.
5. Entrega de Premios del Concurso Científico 2015.
6. Clausura del Acto.

Crónica de la Sesión Inaugural del Curso Académico 2016



Mesa de la Presidencia de izda. A dcha.): D. Juan Ramón Lacadena Calero; D. Jesús Álvarez Fernández-Represa ; D. José Elguero Bertolini, D. Mariano Esteban Rodríguez; D. Manuel Escudero y D. Bartolomé Ribas Ozonas.

El 14 de enero de 2016, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió de gran solemnidad. Presidido por el Presidente de la Corporación Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, quien estuvo acompañado en la presidencia por el Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; el Excmo. Sr. D. Manuel Escudero, Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Medicina, el Excmo. Sr. D. Jesús Álvarez Fernández-Represa, Presidente de la Real Academia de Doctores; del Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Excmo. Sr. D. Juan ramón Lacadena Calero y del Secretario de la misma el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

De acuerdo con el Orden del Día, el Presidente de la RANF hizo la salutación primero, y explicó los éxitos obtenidos por la Academia en 2015. El Académico Secretario leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2015, acompañada con una dinámica presentación, en la que destacó el alto nivel científico alcanzado en las sesiones científicas de la Academia, durante el curso pasado; así como de las publicaciones. Destacó el convenio firmado con el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, además de la Toma de Posesión como Académico de Honor del Profesor Juan José Badimón, además de otras once de Académicos Correspondientes y una de Académico extranjero. A continuación, el Excmo. Señor Don Benito del Castillo García leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre «*Huella farmacéutica española en Filipinas*». Posteriormente, se entregó la Placa conmemorativa por los servicios prestados como Académico Bibliotecario al Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento. Seguidamente se entregaron los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio Alcalíber-Iberoamerica, Premio Cinfa, Premio Juan Abelló, y Premio Antonio Doadrio López, a los jóvenes investigadores que los jurados eligieron merecedores. El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades de Don Josep Ventura, presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y de Don Miquel Yllà-Catalá, ex presidente de la misma; Don, y de Don Santiago Andrés Magallón vicepresidente de la Academia de Farmacia del Reino de Aragón. Clausuró el acto

el Presidente de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2016 en nombre de S. M. el Rey.

Discurso de apertura del curso Académico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

Al iniciar mi discurso de apertura del curso académico 2016 de la RANF quiero en primer lugar expresar mi agradecimiento a los Académicos de la RANF que de forma generosa decidieron con su votación en la Junta General del día 17 de Diciembre del pasado año el que siga ejerciendo las funciones de Presidente de esta docta corporación durante los próximos tres años, con lo cual terminaría mi segundo mandato de acuerdo con las estatutos de la Academia que regulan dos períodos máximos. Muchas gracias por la confianza que han depositado en mi persona y que espero no defraudar. Siempre el inicio de un nuevo año conlleva la presentación de una semblanza de lo que se ha realizado en el curso anterior para de esta forma recordar y valorar logros obtenidos con el fin de impulsar aún mas nuevos objetivos a la vez que corregir errores que se hayan podido cometer. Pero antes de entrar en lo conseguido en 2015, que expondré en mas detalle el Excmo. Sr. Secretario D. Bartolomé Ribas, quiero recordar con afecto a los Académicos que nos han dejado y a los que por motivos de salud no pueden estar hoy con nosotros. También a todos aquellos que han obtenido premios y distinciones que nos honran pues son ejemplo del reconocimiento de la sociedad hacia nuestra Academia. Además mi agradecimiento a todos los Académicos que con su dedicación y esfuerzo contribuyen al buen hacer de la misma.

Su Majestad el Rey Felipe VI ya manifestó que la Reales Academias deben de mantenerse abiertas a la sociedad, y en su discurso de fin de año 2015, resaltó la importancia de lo que nos une para aumentar la competitividad y productividad de España. Indudablemente la RANF juega un papel importante en la misión del fomento de la investigación, asesoramiento al Gobierno de la nación e instituciones públicas y privadas en el ámbito de las ciencias farmacéuticas y del medicamento. Con esa finalidad y como he resaltado en anteriores discursos, queremos crear estímulos para que los programas y actividades de la RANF alcancen a todo el sector farmacéutico, a través de un mayor acercamiento con los farmacéuticos e industria del medicamento, llevando a cabo actividades conjuntas y de asesoramiento, potenciando la visibilidad a nivel social a través de la Web y revistas del sector, elaborando informes en temas de interés farmacéutico-sanitario, incrementando acuerdos con Universidades y centros de investigación nacionales e internacionales, incorporando nuevos Académicos de número y Correspondientes que aporten nueva sabiduría, potenciando la Fundación Casares-Gil de Amigos de la Farmacia, incrementando las ayudas económicas de la RANF a través de búsqueda de otros ingresos externos, incrementando las publicaciones e índice de impacto de los Anales de la RANF, fomentando los premios de investigación farmacéutica de la Academia e incorporando jóvenes investigadores en las actividades de la RANF. Hemos sufrido una reducción considerable en las ayudas a la I+D española lo que ha provocado una erosión de la capacidad investigadora e innovadora de nuestro país. Los jóvenes se ven obligados a emigrar y la pérdida de ese potencial humano nos está pasando factura, al reducirse el potencial científico y competitivo de nuestro país. Aunque la formación científica de los jóvenes españoles en el extranjero se viene realizando de forma continuada desde hace muchos años por ser necesaria y altamente formativa, sin embargo para no perder competitividad necesitamos incrementar el número de investigadores, facilitar su retorno, a la vez que potenciar a los grupos de investigación de nuestro país y mejorar las infraestructuras de los centros. Todo ello con el rigor que se exige de excelencia.

Hemos tenido un año 2015 difícil por los avatares políticos y económicos a nivel nacional e internacional. A pesar de las limitaciones presupuestarias, no obstante la Academia ha llevado a cabo un gran número de actividades sobre las ciencias farmacéuticas y su repercusión social, que incluyen mesas redondas, tertulias, conferencias, encuentros con empresas, con corporaciones farmacéuticas, representantes políticos del Congreso y del Senado, a la vez que se han incorporado nuevos Académicos de Honor, de Número y Correspondientes. También nos hemos abierto más hacia la sociedad a través de la pagina Web y de un vídeo divulgativo de reciente creación, RANF-TV, redes sociales como YouTube, publicaciones en los Anales RANF y de obras singulares y con la creación del Socio Farmacéutico Colaborador RANF para atraer a los farmacéuticos comunitarios y a todos aquellos que quieran conocer mejor y participar en las actividades de la RANF, tanto a nivel personal como a través de convenios marcos. Es de destacar la creación de la Cátedra Juan Abelló sobre “Opiáceos y Tratamiento del Dolor” con el fin de impulsar áreas temáticas en farmacología que incidan plenamente en la mejora de calidad de vida de las personas. En esta misma dirección, se ha creado también la Cátedra Pedro Guillén de “Medicina Regenerativa”, por el interés que las investigaciones sobre el tema van a incidir en salud con la reparación de tejidos dañados.

¿Que es lo que proponemos llevar a cabo en 2016? Lógicamente construir sobre lo edificado y continuar por el buen camino que vamos recorriendo todos juntos manteniendo un alto nivel científico de las sesiones que se presentan en la Academia. Así pues ya tenemos el calendario de actividades en buena medida cubierto hasta finales de año 2016 con un amplio repertorio de conferencias, mesas redondas, encuentros con empresas y asociaciones farmacéuticas. A lo largo del año tendremos algunas singularidades como las tomas de posesión de los Académicos de Honor, Prof Michel Nussenzweig de la Universidad Rockefeller de Nueva York, un

líder mundial sobre el sistema inmune innato y desarrollo de anticuerpos monoclonales de amplio espectro de acción que están revolucionando la lucha contra enfermedades infecciosas y tumorales, y el Prof. Juan Carlos Izpisua-Belmonte del Instituto Salk en la Jolla, California, experto mundial sobre medicina regenerativa y que también está revolucionando los conocimientos sobre el desarrollo embrionario de tejidos y sus aplicaciones en medicina. A lo largo del año incorporaremos nueva sabiduría científica a la Academia con la convocatoria de tres plazas de Académico de Número para de esta forma ir completando la plantilla de académicos RANF que quedaron vacantes. Un reto importante es también incorporar científicos jóvenes a la Academia, que pueden contribuir a dar una mayor visibilidad de la Academia en el entorno científico nacional e internacional. La figura de “Joven Científico RANF”, con investigadores menores de 40 años y con historiales científicos relevantes en farmacia y ciencias afines, puede servir de puente de unión entre los Académicos con aquellos que se están abriendo camino en la ciencia y que pueden ser la semilla del futuro de la Academia.

Un reto importante es dar a conocer a la sociedad la opinión de la Academia en temas de interés como los biosimilares, genéricos, agentes cardiovasculares, resistencias a los antibióticos, enfermedades raras, vacunas, inmunoterapias, nuevos fármacos químicos y biológicos y otros temas a considerar, y su impacto en el sistema sanitario. Conjuntamente con las sociedades farmacéuticas como el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos y Colegio Oficial de Farmacéuticos nacionales debemos de aunar esfuerzos para que nuestra voz se escuche en la sociedad y clase política. También debemos de alzar nuestra voz al próximo Gobierno de la nación que se forme y que tendrá que pactar para llevar a cabo políticas de consenso. Así pues, tenemos la oportunidad de asesorar y poder influir en la esfera política a través de informes de opinión sobre la problemática del sector farmacéutico, optimización y mejora asistencial que ayuden a la toma de decisiones en los temas sanitarios del medicamento. La consecución de un pacto de Estado por la ciencia, educación, cultura y sanidad, es algo que demanda la sociedad y que nuestro país necesita para su mayor competitividad en el mundo actual donde el conocimiento es la base de una economía dinámica y sostenible. En este sentido debemos de actuar conjuntamente con el resto de las Academias que configuran el Instituto de España.

La colaboración entre academias afines sobre temas de interés común, como las Reales Academias de Medicina, Ciencias y Farmacia, es una actividad que ya venimos desarrollando desde hace tres años con el nombre de “Triaca” y que continuaremos en este curso con la organización por la Academia de Medicina del encuentro conjunto sobre el tema “Enfermedades y Cambio Climático”, que la sociedad percibe como efectos colaterales a los que tenemos que prestar atención y adecuar políticas de control. El caso de enfermedades producidas por parásitos, hongos, bacterias y virus que se extienden por los cambios climáticos y flujos migratorios deben alertarnos.

Otra actividad de la Academia es la organización de cursos dirigidos a estudiantes y profesionales del sector sobre temas de interés, para lo que continuaremos con la organización del tercer curso sobre Obesidad y alimentación. Este año inauguraremos un nuevo curso sobre fertilidad y anticonceptivos, que confiamos tenga también tanto éxito como el de obesidad. A los organizadores de ambos cursos mi mas cordial felicitación y ánimos para seguir adelante.

Con la finalidad de incrementar la financiación para la organización de actividades científicas en la Academia seguiremos colaborando con empresas a través de acuerdos marcos que nos permiten incrementar el número de conferencias y mesas redondas. El curso pasado firmamos un acuerdo marco con el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, y ya llevamos cuatro acuerdos marcos, esperando firmar otros acuerdos a lo largo de este curso.

Finalmente quiero agradecer a la Junta de Gobierno, Junta General, Secciones y Comisiones, así como a todos los Académicos por el trabajo realizado que ha contribuido a mantener los niveles de excelencia que todos nos exigimos en la RANF. Especial mención, al personal administrativo de la Academia por su constante dedicación y cumplimiento de las obligaciones diarias.

Con los mejores deseos a todos para este nuevo año 2016, he dicho.

MEMORIA DE SECRETARÍA. CURSO 2016

Memoria Anual de Secretaría Año 2016



Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia



Excmo. Sr. Presidente de la Real Acad. Nal. de Farmacia;
Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales; Vicepresidente de la Real Academia de Me-
dicina, Excmas. Sras. y Sres. Académicos, Presidentes y delega-
dos de las Academias de Farmacia de, Cataluña, Reino de Aragón,
y Santa María de España, Sras. y Sres.

Esta Real Academia Nacional de Farmacia que, bajo la direc-
ción de su Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, inició las
actividades del Curso Académico 2015, con la celebración de la
Solemne Sesión Inaugural el 22 de enero, contando con la presen-
cia de los Académicos Presidentes del Instituto de España de las
Reales Academias de Ciencias, Exac. Fís. y Naturales, y de la
Real Academia de Doctores de España, así como los Presidentes y
delegados de las 6 Academias de Farmacia de España.

Tras unas palabras de salutación del Presidente, D. Mariano
Esteban Rodríguez, el Académico Secretario que les habla, proce-
dió a la lectura de la Memoria de Secretaria del año 2014. Y a
continuación, el Académico Don Javier Puerto Sarmiento, pronunció el discurso reglamentario, titulado
“Ciencia de doble uso: los farmacéuticos y los gases tóxicos durante la Guerra Civil Española (1936-1939)”.
Intervenciones todas ellas, que fueron publicadas “in extenso” en la revista Anales de esta Academia.

Se hizo entrega de una medalla Carracido, en su categoría de Oro, a D. Juan Uriach Marsal, por su gestión
en el ámbito de la Farmacia, industria farmacéutica y por la extensa biblioteca personal de naturaleza pública
única en su género de Ciencias Sanitarias.

Y para finalizar la Sesión solemne, se procedió a la entrega de los Premios del Concurso Científico 2014.
Antes de dicha Sesión inaugural se celebró solemne funeral, en la Iglesia de San Ildefonso de Madrid, por los
Académicos fallecidos, oficiado por el sacerdote Académico Correspondiente y Catedrático de las Facultades
de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y de Teología de la Universidad de Navarra, D. José
Manuel Giménez Amaya.

“In Memoriam”

Hemos de lamentar la pérdida por el fallecimiento del compañero Académico de Número D. Nicolás Víctor
Jiménez Torres, que por inesperada y por su intensa actividad académica y significativo promotor de la ciencia
hospitalaria en España, conmovió a los miembros de esta Corporación.

Y tuvo lugar una Sesión Necrológica, en memoria del Académico D. Perfecto García de Jalón y Hueto, con
la Medalla nº 7, en la que intervinieron los Académicos Sres. D. Albino García Sacristán, D. Juan Tamargo
Menéndez y D. Bartolomé Ribas Ozonas, sobre su ejemplar y enriquecedora personalidad científica y humana.

Actividades Científicas

La intensa y relevante actividad científica, como es tradicional en nuestra Corporación, se ha llevado a cabo en Sesiones de jueves, intercalando en otros días de la semana, conferencias y sesiones conjuntas con otras Reales Academias, con laboratorios diversos de la Industria farmacéutica y Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, para dar curso y fluidez a la actividad desarrollada por los miembros de nuestra corporación y Fundación Casares Gil.

Las conferencias y Mesas Redondas colgadas en la página WEB, han sido objeto de numerosas felicitaciones por académicos, tutores universitarios y profesores de másteres, por estar disponibles y ser utilizadas por profesores y alumnos universitarios.

Una de las actividades prioritarias de esta Academia (RANF) es la difusión de la ciencia y del conocimiento para la formación de la juventud universitaria y científica, así como de la sociedad y de la humanidad, con la difusión de los programas de actividades y de los resúmenes de sus Sesiones científicas a más de 500 direcciones. Para ello se tienen Convenios, las 4 Universidades del Área de Madrid, el Colegio Of. de Farmacéuticos de Madrid y COFARES; sigue adelante el curso avanzado sobre obesidad; y planificado un nuevo curso sobre "Mecanismos fisiológicos y moleculares sobre fertilidad y contracepción".

Mencionamos la propuesta de la Subsecretaría del Ministerio de Industria de colgar en nuestra página web para el reenvío de sus inquietos peticionarios, de un Resumen de la Mesa Redonda sobre "Campos electromagnéticos y Salud"; el importante ofrecimiento por la Secretaría de Estado a través de la Ilma. Sra. Dña. Carmen Vela Olmo, de participar con otras seis instituciones en la elaboración de documentos para aconsejar al Presidente de la Comisión Europea Sr. Jean Claude Juncker, en temas de evidencia científica en la especialidad del medicamento y ciencias afines. Y el ofrecimiento de la Academia Nacional de Farmacia de Francia para colaborar estrechamente ambas Academias nacionales.

Incorporación de nuevos Académicos.

Como Académico de Honor tomó posesión D. Juan José Badimón Director de la Unidad de Atherothrombosis, del Instituto Cardiovascular, del Mount Sinai School of Medicine, de Nueva York.

Y como Académicos Correspondientes tuvieron lugar 12 incorporaciones, 11 de ellas Académicos nacionales, Dña. Ascensión Marcos Sánchez, D. Godofredo Diéguez Castrillo, D. Eloy García Calvo, D. Félix Goñi Urcelay, Dña. Esperanza Torija Isasa, D. Wolfredo Wildpret de la Torre, D. Enrique Granda Vega, D. José Luis Pedraz Muñoz, Dña. Margarita del Val Latorre, Dña. María Soledad Campos Díez y Dña. Beatriz de Pascual-Teresa.

Y la eminente Académica extranjera, la Ilma. Sra. Dña. Sylvia Daunert, profesora de Bioquímica y Biología Molecular reconocida internacionalmente por su trabajo y numerosas patentes en Química Bioanalítica.

La Fundación José Casares Gil, de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Ha contribuido con su patronazgo, al desarrollo de las actividades científicas, Mesas Redondas, cursos, y difusión de la ciencia con prioridad en la juventud universitaria en temas de enseñanza y futuro de la investigación en Farmacia y sus Ciencias afines.



Conferencias

Las describimos a continuación, organizadas por las diversas Secciones, sobre temas de actualidad.

El Prof. Dr. Luis Enjuanes, Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Sup. de Invest. Científicas, disertó sobre el tema **"VIRUS EMERGENTES: CORONAVIRUS Y VIRUS ÉBOLA"**, en Sesión coordinada por el Presidente, D. Mariano Esteban Rodríguez; El Presidente de la Real Academia de Doctores de España, D. Jesús Álvarez Fernández-Represa nos deleitó sobre **"TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA OBESIDAD"**, como colofón al curso avanzado de obesidad, dirigido Dña. María Cascales Angosto; El Prof. D. Antonio Rodríguez Artalejo, nos ilustró con su conferencia **"EL RECEPTOR ALFA-2 ADRENÉRGICO DE LA CÉLULA CROMAFÍN DE LA MÉDULA ADRENAL: ¿UNA NUEVA DIANA PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO?"**; El Prof. Santiago Mas-Coma, de la Facultad de Farmacia de Valencia, nos habló sobre **"LA HOJA DE RUTA 2015-2020 DE ORG. MUNDIAL DE LA SALUD, SOBRE ENFERMEDADES PARASITARIAS OLVIDADAS"**; D. Francisco González de Posada, Académico correspondiente de esta Academia, y Numerario de la de Medicina, disertó sobre el tema **"ALBERT EINSTEIN, 100 AÑOS DE RELATIVIDAD GENERAL: EL UNIVERSO QUE CONOCEMOS HOY"**; D. Jorge Alvar, Jefe del programa de Leishmaniosis en Drugs for Neglected Disease initiative, de Ginebra, nos hizo reflexionar sobre **"MEDICAMENTOS PARA ENFERMEDADES OLVIDADAS: MODELO Y LÍNEAS PRIORITARIAS EN LEISHMANIASIS VISCERAL"**; D. Antoni Esteve Cruella, Presidente de Farmaindustria y del Consejo de Administración de Esteve Teijin Health Care actualizó el tema **"EL COMPROMISO CON LA SOCIEDAD"**

EN NUESTRO ADN. LA RESPONSABILIDAD SOCIAL FORMA PARTE DE LA IDENTIDAD DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA".

Tuvo lugar el importante evento de la presentación de la primera "Cátedra Juan Abelló" en honor a nuestro compañero Académico **D. Juan Abelló Gallo**, quien impartió la conferencia "**OPIÁCEOS Y TRATAMIENTO DEL DOLOR**", y que fue presentada por D. Juan Tamargo Menéndez, con asistencia de numeroso público. Por donación del mismo compañero Académico Juan Abelló, fue descubierto en la Galería de cuadros de Presidentes, y ante numeroso público, el correspondiente a la ex Presidenta Dña. María Teresa Miras Portugal.

Mesas Redondas

Sobre "VIRUS EMERGENTES II: EPIDEMIOLOGÍA, TRANSMISIÓN, MORFOLOGÍA, BIOLOGÍA Y PREVENCIÓN (VACUNAL) DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS CHIKUNGUNYA"

Coordinada por D. Antonio R. Martínez Fernández iniciando la exposición del tema con el título "Introducción a los arbovirus"; Intervino el Prof. D. Ricardo Molina, Entomólogo del Instituto de Salud Carlos III, que disertó sobre el "Aedes albopictus: morfología, biología, emergencia y papel vectorial"; y el Presidente del RANF, D. Mariano Esteban Rodríguez, nos ilustro con el tema "Virus Chikungunya. Nueva vacuna protectora"



Mesa Redonda sobre "**MEDICINA REGENERATIVA**", que fue presentada por el Presidente. D. Mariano Esteban Rodríguez, y en la que intervinieron los ponentes: Prof. Juan Carlos Izpisua Belmonte, del Gene Expression Laboratory, del Instituto Salk de Estudios Biológicos, de la Universidad La Jolla, California, EE.UU. con el título "Presente y futuro de la medicina regenerativa"; y el Prof. Pedro Guillén García, Fundador y Director de la Clínica CEMTRO, de Madrid, que disertó sobre "Aplicación de Medicina Regenerativa en España desde 1996, en la articulación dañada (Rodilla, tobillo y cadera)", que atrajo gran afluencia de público.

Mesa Redonda conjunta con la Soc. Esp. de Nutr. Parenteral y Enteral (SENPE) titulada "**AVANCES EN NUTRICIÓN CLÍNICA: DE LA DIETOTERAPIA A LA NUTRICIÓN PARENTERAL**", Presentada por D. Juan Ramón Lacadena Calero y con unas palabras del Presidente de la SENPE, D. Miguel León Sanz; Moderada por el académico D. Francisco José Sánchez Muniz. Presentaron ponencias la Dra. Cleofé Pérez Portabella, Profesora de Nutrición Humana y Dietética de la Universidad de Vich, con título: "Contribución de la Enfermería y de la Dietética al manejo nutricional de los pacientes hospitalizados"; y el Dr. Daniel Cardona Pere, del Servicio de Farmacia del Hospital Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona, con el título: "Papel del farmacéutico de hospitales en el equipo multidisciplinar de soporte nutricional".

Mesa Redonda sobre "**CAMPOS ELECTROMAGNETICOS Y SALUD**" presentada por el Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, y que contó con las ponencias de los Académicos de Número de las Reales Academias de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y Nacional de Farmacia D. Antonio Hernando Grande y D. Bartolomé Ribas Ozonas, que disertaron respectivamente sobre: "Características y dosis de los campos electromagnéticos en nuestro ambiente" y sobre: "Efectos fisiológicos de los campos electromagnéticos en función de la dosis-efecto según Paracelso)".

Como todos los años, se celebró la **MESA REDONDA CONMEMORATIVA DE LOS PREMIOS NOBEL 2015**, coordinada por el Académico D. Juan Ramón Lacadena Calero, en la que intervinieron D. Antonio Martínez Fernández; y el Correspondiente D. Manuel Benito de las Heras.

Finalmente el año 2015 concluyó con la Mesa Redonda sobre "**ENVEJECIMIENTO**" con la coordinación de D. Ángel María Villar del Fresno, y que contó con las ponencias de los Dres. D. José Manuel Ribera Casado sobre "CAMBIOS FISIOLÓGICOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO" y de D. Gustavo Barja de Quiroga sobre "ESTRÉS OXIDATIVO Y LONGEVIDAD".

Y finalmente, mencionar, las dos Mesas Redondas donde los miembros de la Comisión de Aguas Minerales y Minero-medicinales, que Preside Dña. María del Carmen Francés Causapé, expusieron trabajos sobre el **BALNEARIO DE VILLAVIEJA (Castellón)**, y cuyos miembros se reunieron además en tres ocasiones.

Cursos

La Fundación de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia auspició y promovió la Segunda edición del prestigioso **“CURSO AVANZADO SOBRE OBESIDAD”**, del que fue Directora Dña. María Cascales Angosto, y coordinado por los Académicos D. Francisco José Sánchez Muniz, D. Antonio Luis Doadrio Villarejo y D. Bartolomé Ribas Ozonas. Contó con las intervenciones de eminentes científicos de España, EE.UU. y Chile. Se priorizó la difusión entre la juventud estudiantil de las Universidades Complutense de Madrid, Alcalá de Henares, C.E.U y Francisco de Vitoria, y que por su elevado número de alumnos, superior a los doscientos, se repitió en dos semanas consecutivas; y retransmitido a Iberoamérica con alumnos en Chile, Argentina, Brasil y México.



Jornadas Científicas.

Cabe destacar, las tres jornadas organizadas por la Fundación José Casares Gil, su Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez y Secretario D. Honorio Carlos Bando Casado con los títulos: la primera sobre **“Ética y transparencia en la investigación biomédica”** con el patrocinio de los laboratorios Lilly.

La segunda sobre **“Educación en Salud en las Oficinas de Farmacia”** con el objetivo de impulsar una mejor formación en Salud en las Oficinas de Farmacia, y en la línea de colaboración con la industria farmacéutica, con la empresa Merk, Sharp & Dohme (MSD) dedicada a la investigación, producción y comercialización de fármacos para la salud humana, y con el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid.

Y la tercera, también en colaboración con la sede de Merck Sharp & Dohme, tuvo por título: **“Nuevos avances en la terapia oncológica: la inmunoterapia”**.

Como viene siendo tradición se celebró el **“III Encuentro entre Diputados y Senadores con Académicos de las RR. AA. de Medicina y de Farmacia”**; este año 2015 en el marco del Senado. Encuentro, en el que los Académicos y miembros de las “Comisiones de Sanidad” del Congreso y del Senado analizaron el tema “La prevención y promoción de la salud pública desde la perspectiva de los profesionales sanitarios”. Durante cuya reunión se concluyó en la necesidad de la colaboración conjunta y la responsabilidad de la continuidad de estas reuniones en beneficio de la sociedad española.



Otro acontecimiento relevante, que tiene lugar de forma anual fue la reunión de las tres RR. AA. del Instituto de España, la de Ciencias, de Medicina y la de Farmacia, en la Sede de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, con el título **“ENVEJECER SIN DEMENCIA”**, que contó con la participación como ponentes de los Académicos Sres. D.ª María Teresa Miras-Portugal, de Farmacia; D. Enrique Blázquez Fernández de Medicina y de D. Jesús Ávila de Grado de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Esta Academia siempre abierta a los profesionales farmacéuticos, a sus actividades y a las de las ciencias afines, con una clara transparencia y apertura a la Sociedad española, albergó, la “Presentación Pública del Libro: Política y Evaluación de Medicamentos Hospitalarios” junto con la Fundación Gaspar Casal, abundando en la difusión científica en el ámbito farmacéutico y en concreto del medicamento.

Así como en la entrega de Premios de la Asociación Española de Farmacéuticos de Artes y Letras (AEFLA).

Reuniones académicas internas

La Actividad Académica se complementa con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las Secciones se reunieron en 18 ocasiones y las Comisiones en 10. Además la Junta de Gobierno tuvo 10 Sesiones, y la Junta General se reunió en 3 ocasiones de forma Ordinaria y 4 en Sesión Extraordinaria.

Juntas Generales: Durante el año 2015, se celebraron elecciones en los cargos de Presidente siendo reelegido Don Mariano Esteban Rodríguez; y de Bibliotecario, para el que fue elegida Doña Rosa Basante Pol. Ambos fueron vivamente aplaudidos y felicitados al acabar cada sesión por todos los Académicos asistentes.

Por otra parte, al acabar según Estatutos, sus dos periodos consecutivos de Bibliotecario, D. Javier Puerto Sarmiento fue vivamente felicitado en agradecimiento a sus constantes consejos, sabiduría y virtudes humanas por todos los miembros de la Junta de Gobierno. Asimismo recibió una gran ovación y recibió el agradecimiento de todos los compañeros de Junta General, por la gran labor con efectividad y eficacia al frente de la Biblioteca y Museo de esta Real Academia. Para este Académico que les habla, ha sido un placer y expreso mi testimonio de mi consideración más distinguida y agradecida por su amistad y sabios consejos al compañero Académico Javier Puerto Sarmiento.

En las correspondientes Juntas Generales Extraordinarias de junio y diciembre respectivamente, fueron elegidos Académicos de Honor el eminente Dr. Michel C. Nussenzweig, por su liderazgo mundial en el conocimiento de las bases moleculares de la respuesta inmune y el Excmo. Sr. D. Juan Carlos Izpisua Belmonte por sus pioneros trabajos sobre medicina regenerativa.

Asimismo en sendas Juntas Generales extraordinarias fueron elegidos los eminentes Dres., D. Sebastián Cerdán García Esteller. Para ocupar la vacante de Académico de Número, Medalla nº 30 y Dña. Yolanda Barcina Angulo para ocupar la vacante de Académica de Número medalla nº 31. Ambos con una amplia y dilatada vida investigadora y docente al servicio y abiertos a la Sociedad española. Ambos renuevan la plantilla académica, siempre en continua regeneración y actualidad.

Premios y distinciones recibidas por los Excmos. Sres. Académicos

La Academia son sus Académicos y los éxitos de estos dan brillo y esplendor a la misma.

Dña. María Vallet Regí tomo posesión como Doctora Honoris Causa por la Universidad Jaime I de Castellón.

D. Antonio Luis Doadrio Villarejo tomo posesión como “Académico de Número” de la Real Academia de Doctores de España.

D. Juan Tamargo Menéndez ha sido elegido por la Fundación BBVA para la concesión de una, de las cinco ayudas, entre 324 proyectos de investigación presentados. Con un proyecto en el Área Cardiovascular del que es investigador principal.

D. Benito del Castillo García, recibió un doble homenaje en la ciudad de Mérida, Venezuela, por parte del Concejo Municipal nombrándole “huésped distinguido” de dicha ciudad estudiantil; y, recibió el diploma de “Colegiado de Honor” del Colegio de Farmacéuticos del Estado de Mérida, tras participar en varias conferencias y diversos actos académicos de la Universidad de los Andes, de la que es Doctor Honoris Causa.

Dña. María del Carmen Francés Causapé, fue nombrada “Miembro de Honor” del Instituto Médico-Farmacéutico de Cataluña.

D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, fue galardonado con el “Premio Albert Jovell” a la mejor iniciativa desarrollada por profesionales sanitarios que mejoran los resultados de salud de los pacientes. Trabajo denominado “Tormes Team”, dedicado al tratamiento integral de los pacientes VIH en el Hospital Universitario de Salamanca.

D. Jesús Jerónimo Pintor Just lidera un grupo de excelencia investigadora llamado OCUPHARM que investiga sobre “una lentilla ‘inteligente’ que libera el principio activo del medicamento incorporado a la misma de forma gradual. Considerada una Innovación revolucionaria.

Distinciones a los Ilmos Sres. Académicos Correspondientes

Que prestigian a la Academia y que en atención al tiempo, enumeramos sucintamente, lo que también “in extenso” será publicado en la Memoria general.

Dña. Carmen Peña López recibió el “Premio de la Real Academia de Farmacia de Cataluña” fue elegida “Académica de Honor” de la Academia de Farmacia de Castilla-León y recientemente fue elegida “Farmacéutica del año” por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España.

D. Pedro Guillen García, le ha sido entregado el título y diploma “FIFA Medical Centre of Excellence”, del deporte mundial, lo que honra a los ambientes científicos, deportivos y sanitarios de nuestro país. Fue investido “Doctor Honoris Causa” por la Universidad Pontificia de Salamanca. Y organizó el “XIV Simposio Internacional Clínica CEMTRO”, en el que intervinieron eminentes científicos de EE.UU, México, Francia y Bélgica, y varios Académicos de Número, de Honor, y correspondientes de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

D. Alfredo Martínez Hernández, tomó posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña.

D. Francisco González de Posada obtuvo su 4º título de doctor, con el nuevo doctorado en Filosofía, por la Universidad Pontificia de Salamanca con título: "En torno al tiempo", y elegido de "Gaditano del Año".

D. Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata tomó de posesión como Académico Correspondiente de la de Farmacia de Castilla y León. Y se le impuso la "Medalla de Honor de la Universidad Complutense de Madrid", por el Magnífico Sr. Rector D. Carlos Andradás Herranz.

D. Eduardo L. Mariño Hernández, "tomó posesión" en la Academia de Farmacia de Paraguay.

Felicitamos a la Dra. María del Carmen de la Rosa Jorge, por sus 50 años de labor docente e investigadora en la Universidad española.

Otras Actividades de académicos que enaltecen la de esta academia

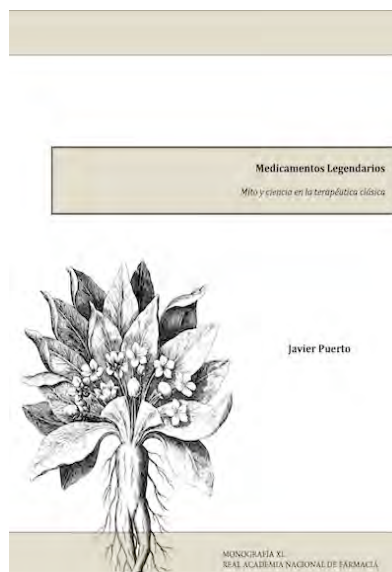
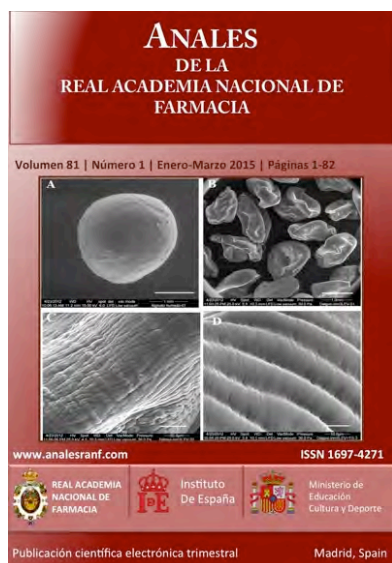
Ha sido publicado "on line" la segunda edición del libro "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs" editado por Elsevier, del que son autores la Excm. Sra. Dña. Carmen Avendaño López y el Profesor D. José Carlos Menéndez, Académico Correspondiente.

El libro "Monitorización de fármacos en la práctica clínica", obra coordinada por D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Y un segundo libro con el título: "Medicamentos falsificados", por D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y el Dr. Paulo Teixeira da Silva, de la Universidad de Salamanca.

Publicaciones

Se han editado "on line" los 4 números de la revista "Anales" correspondientes al año 2015. Así como el número 5, correspondiente al Balneario de Villa de Olmedo (Valladolid).

Y como todos los años, se ha publicado en papel, el Discurso de la Sesión Inaugural ya mencionado, y el "Anuario" nº 67 de la institución, que pasa a llamarse por decisión de Junta General Ordinaria "Anuario 2016 (Actividades 2015)".



Así mismo, se han publicado "on line" el libro sobre el "Segundo Curso Avanzado de Obesidad" y la obra "Medicamentos Legendarios: Mito y ciencia en la terapéutica clásica".

Todas estas mencionadas obras, han sido coordinadas por nuestro Académico Excmo. Sr. Antonio Luis Doadrio Villarejo, y se publicaron en formato de libro electrónico o "e-book" en edición "on line" y digital DVD para PC Windows y Mac.

Biblioteca, Archivo y Museo

En cuanto a la Biblioteca y el Archivo, el año 2015 como en los anteriores bajo la dirección del Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento, con su eficacia y sabiduría, ha sido también de gran significado científico y social, por el trabajo en equipo en relación a la revista Anales, prestación de libros, actividad de ayuda y colaboración para los académicos y recepción de nueva ayuda para digitalización, entre otros temas de relevancia para la Academia.

En el proyecto de digitalización del fondo antiguo e histórico, de nuevo el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte ha concedido una nueva subvención, para el proyecto presentado por el Director de la Biblioteca

D. Javier Puerto Sarmiento. Esta nueva ayuda se aplicará para iniciar la digitalización de los libros del siglo XIX.

En cuanto a la revista “Anales” se han recibido y maquetado todos los artículos correspondientes a los cuatro números del año 2015.

Se han producido 199 altas de libros, revistas y fotografías en el catálogo de la biblioteca.

Como es costumbre del más alto servicio y dedicación a todos los académicos y bien de la ciencia, investigación y de la cultura de nuestro país, se ha atendido a quienes han solicitado nuestro servicio y nuestra ayuda desde la Biblioteca. Formamos un equipo solicito para ayudar con la dedicación y empeño a quienes nos necesitan, también a usuarios externos.

Se han prestado revistas y libros, a través de los distintos medios, incluyendo digitalizaciones. Ha habido varios investigadores debidamente identificados que han sido autorizados para la consulta de documentos de nuestro archivo histórico.

Por último, agradecemos las donaciones recibidas por parte de los siguientes Académicos: Cabezas Fernández del Campo, Ortega Mata, Ribas Ozonas, Fernández Braña y González Bueno. Y muy especialmente a la Excm. Sra. Dña. María Cascales, por la donación de su archivo personal recopilado por ella misma a lo largo de su carrera profesional y científica.

El Museo de la Farmacia y la Sala Utagawa han sido muy visitados por grupos de instituciones, como en años anteriores, acompañados principalmente por el Jefe de Negociado, Don Manuel Tirado y en ocasiones por este Académico Secretario.

Agradecimientos

Expresamos nuestro profundo agradecimiento al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por las diversas ayudas recibidas. Por la ayuda especial para restauración de las fachadas exterior e interna del patio. Así como que, gracias a la subvención presupuestaria recibida en el Curso 2015, hemos podido realizar las actividades científicas programadas, el mantenimiento de la página web, y el mantenimiento de nuestro personal. Y la nueva subvención 2015 para proseguir en adelante con la digitalización de la Biblioteca.

Esta Real Academia agradece a la Real Academia de Jurisprudencia y Legislación y a su Académico Excm. Sr. D. José Ángel Martínez Sanchiz, ilustre notario de Madrid, los servicios prestados por la confección del “Acta de notoriedad y propiedad” de la colección de grabados ukiyo-e del periodo Edo de 1750 – 1850 de Japón.

Agradecer a nuestro querido compañero, D. Juan Abelló Gallo, su inestimable ayuda y colaboración, la “Cátedra Juan Abelló” para el estudio del dolor; así como para el concurso de premios, a todos sus patrocinadores; a D. Pedro Guillén García por la reciente aceptación de la propuesta en Junta General Ordinaria de la “Cátedra Pedro Guillén” para investigación y difusión de la medicina regenerativa, a CINFA en la persona de D. Luis Ordières, al Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, y al Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y al Premio Antonio Doadrio López. Todos ellos posibilitan premiar la labor científica principalmente de jóvenes investigadores. Asimismo la Academia y sus Académicos, agradecen a los Patronos, miembros y socios de la “Fundación José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, su importante contribución y dedicación a las actividades académicas de difusión de la ciencia y formación de la juventud y de la sociedad española; y a gran número de Colegios de Farmacéuticos de España que en atención a la brevedad de esta exposición no podemos enumerar. Para todos ellos el agradecimiento de esta Real institución académica

Termino dando las gracias a todos los Académicos de Número y Correspondientes por la colaboración prestada, tanto a aquellos que han participado día a día en las actividades realizadas en esta sede académica, a los que han organizado e intervenido con interesantes conferencias y temas de actualidad, como a los que han permitido con su asistencia y contribución, colocar esta Real Academia en lo más alto del nivel científico y de mayor prestigio entre las instituciones españolas. Y al personal contratado, que con su exquisito trato a los Académicos, dedicación y esfuerzo, mantienen día a día el funcionamiento de la misma.

Muchas gracias por su atención.

Madrid, 22 de enero de 2016

El Académico Secretario
Dr. Bartolomé Ribas Ozonas



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el primer trimestre del año 2016, tuvieron lugar numerosas reuniones en nuestra sede académica, que se concretaron en 10 Sesiones científicas académicas, y múltiples reuniones de Secciones, tertulias científicas, actos de presentación de libros, y con otras instituciones como la Fundación Ciencias de la Salud, la Academia de Ciencias Odontológicas, Astellas Farma, el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Cofares y ASEDEF.

El 14 de enero de 2016, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la solemne sesión de inauguración de Curso Académico en un acto presidido por el Presidente de la Corporación Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, quien estuvo acompañado en la presidencia por el Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; el Excmo. Sr. D. Manuel Escudero Fernández, Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Medicina, el Excmo. Sr. D. Jesús Álvarez Fernández-Represa, Presidente de la Real Academia de Doctores de España; del Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero y del Secretario de la misma el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

De acuerdo con el Orden del Día, el Presidente de la RANF pronunció unas palabras de salutación, y explicó los éxitos obtenidos por la Academia a lo largo del año 2015. Seguidamente el Académico Secretario leyó la *Memoria de Actividades Académicas correspondiente al año 2015*, acompañada con una dinámica presentación gráfica proyectada, en la que destacó el alto nivel científico alcanzado en las sesiones de nuestra Academia, durante todo el curso pasado; así como de las publicaciones científicas. Destacó el Convenio firmado con el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, además de la Toma de Posesión como Académico de Honor del Profesor Juan José Badimón, y de otras once de Académicos Correspondientes, con una de Académico extranjero. A continuación, el Excmo. Señor Don Benito del Castillo García leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre «*Huella farmacéutica española en Filipinas*» que despertó gran interés en la numerosa audiencia que abarrotaba la sala y aledaños.

Después del mencionado discurso, se entregó la Placa conmemorativa por los servicios prestados como Académico Bibliotecario al Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento. Seguidamente se entregaron los Premios del Concurso Científico, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio Alcalíber-Iberoamérica, Premio Cinfa, Premio Juan Abelló, y Premio Antonio Doadrio López, a los jóvenes investigadores que las respectivas Comisiones propusieron a la Junta de Gobierno como merecedores de los mismos. El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades, de, Don Josep Ventura Ferrero, Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y de Don Miquel Ylla-Catalá, ex presidente de la misma; y de Don Santiago Andrés Magallón vicepresidente de la Academia de Farmacia del Reino de Aragón. Clausuró el acto el Presidente de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2016 en nombre de S. M. el Rey.

El 21 de enero la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF, organizaron la celebración de la Conferencia titulada: "*La melatonina algo más que un inductor del sueño*". Fue impartida por el Académico de Número el Excmo. Sr. D. Jesús J. Pintor Just.

El 28 de Enero tuvo lugar la atractiva conferencia titulada: "*Los hongos y el cambio climático*". Fue impartida por el Dr. Gabriel Moreno Horcajada, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Alcalá de Henares, que fue presentado por el Académico de Número el Excmo. Sr. D. Fidel Ortega y Ortiz de Apodaca.

El 4 de febrero tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Farmacia, también con el patrocinio de Fundación José Casares Gil, la MESA REDONDA "*La botánica en la España de la Ilustración. Ciencia y poder a través de una saga familiar: Los Horteiga/Ortega*". Fue presentada y coordinada por la Excm. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, y contó con las siguientes ponencias: Excm. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, su organizadora y Académica, con el título "*Los inicios: José Horteiga (1703-1761)*", el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, también Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia disertó con el título "*La*

plenitud: Casimiro Gómez Ortega (1741-1818)"; y el Ilmo. Sr. D. Antonio González Bueno Académico Correspondiente de esta Real Academia Nacional de Farmacia intervino con el título: "*El agónico final: Hipólito Ruiz López (1754-1816)*".

El día 11 de febrero la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, celebraron la Mesa Redonda "*Cáncer y Envejecimiento*" que fue presentada por la Excm. Sra. Dña. María Vallet Regí y que contó con las siguientes ponencias: Excm. Sra. Dña. María Vallet Regí, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia: "*¿Existe relación entre Cáncer y Envejecimiento?*" y el Excmo. Sr. D. Mariano Barbacid, Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia, es también Profesor AXA-CNIO de Oncología Molecular en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid. Su intervención llevó por título: "*De la Oncología Molecular a las Terapias Personalizadas: Lo que hemos aprendido en este siglo*".

El conferenciante, Marino Barbacid, nos ilustró magníficamente sobre que, en los 15 años que llevamos de siglo, hemos sido testigos de una serie de avances científicos en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la progresión tumoral que están empezando a tener una incidencia importante en la práctica clínica de las enfermedades neoplásicas. Por ejemplo, los fármacos aprobados por la FDA y la EMEA durante estos años han sido en su gran mayoría moléculas selectivas contra dianas moleculares directamente implicadas en el desarrollo tumoral, como por ejemplo Transtuzumab (Herceptina) para ciertos tipos de tumores de mama, Imatinib (Gleevec) para la leucemia mielógena crónica o Erlotinib (Tarceva) para el cáncer de pulmón no microcítico portador de mutaciones en el receptor del EGF. Más recientemente, se han producido importantes avances en el tratamiento de ciertos tipos de tumores, sobre todo el melanoma metastásico, gracias al descubrimiento del papel de los "*immune-checkpoints*" en el control de la respuesta inmune durante el desarrollo tumoral. Estos descubrimientos también han permitido una mejor estratificación de los tumores haciendo que los tratamientos sean cada vez más selectivos (y personalizados) y por consiguiente más eficaces. Desgraciadamente, no toda la información generada en estos años ha podido aplicarse a obtener mejoras en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, durante este periodo hemos podido comprobar que los tumores tienen una gran plasticidad y pueden evolucionar rápidamente produciendo resistencias a los tratamientos selectivos anteriormente mencionados. Por ejemplo, pacientes tratados con Erlotinib o Imatinib desarrollan resistencias a los pocos meses debido a mutaciones en la propia diana contra la que actúan estos fármacos. Si bien algunas de estas mutaciones pueden ser a su vez tratadas con una nueva generación de fármacos, esto no es siempre posible. En otros casos, como sucede con los inhibidores de B-Raf, las resistencias no se deben a mutaciones en la diana si no a la activación de rutas de señalización alternativas, lo cual complica el tratamiento de estos tumores resistente ya que requieren el uso de combinaciones de fármacos que pueden presentar problemas por la acumulación de toxicidades. Quizás el aspecto más preocupante de todos los avances que hemos experimentado con el mejor conocimiento de las enfermedades neoplásicas ha venido dado por el desarrollo de las técnicas de secuenciación masivas que nos están permitiendo conocer el genoma de miles de tumores. Estos estudios han revelado que los tumores, sobre todo los tumores sólidos, son mucho más complejos de lo que hubiéramos podido imaginar. La media de la carga mutacional de un amplio espectro de tumores está alrededor de 3.000 mutaciones por tumor. Es evidente que no todas estas mutaciones participan directamente en el proceso tumoral. Aún así, el análisis bioinformático tanto de las mutaciones "missense" como otras alteraciones genéticas como amplificaciones, deleciones, reordenamientos etc. nos indican que la gran mayoría de los tumores tienen alteradas múltiples rutas de señalización así como otras funciones celulares básicas para nuestro organismo. Por lo tanto, el cáncer se nos está presentando como una enfermedad multigénica cuya curación, más allá del "clásico" parámetro de supervivencia a 5 años con el que se miden hoy en día las "curaciones", va a requerir intervenir y controlar un número importante de distintos procesos celulares. Por último, el análisis de tumores por secuenciación masiva también nos ha revelado que la gran mayoría de los cánceres no son una entidad única sino un conjunto de clones, que si bien comparten un número determinado de mutaciones y alteraciones, hay un porcentaje importante que solo existen en una parte del tumor, probablemente como consecuencia de una evolución divergente de distintos clones celulares dentro del mismo tumor. Ni que decir tiene que conocer que mutaciones son troncales (están en todo el tumor) y cuales han aparecido durante la progresión tumoral, incluida la metástasis, será esencial para decidir que estrategias terapéuticas hay que seguir en cada caso, pues es obvio que si bloqueamos dianas que solo estén mutadas en una parte del tumor, el efecto terapéutico tendrá un valor muy limitado. En resumen, los últimos 15 años nos han proporcionado una información tremendamente valiosa acerca de los mecanismos moleculares responsables del desarrollo tumoral. Estos conocimientos han redundado en el desarrollo de terapias más eficaces y menos tóxicas. Pero al mismo tiempo esta información nos ha hecho ver que el enemigo es mucho más complicado de lo que habíamos pensado. Por lo tanto, la conquista del cáncer, o al menos de aquellos tipos de cáncer que presentan peores índices de supervivencia (la mayoría de los tumores sólidos no hormonales) es un reto que no va a ser fácil de resolver, al menos durante las próximas décadas.

El 18 de febrero de 2016, la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo el honor de celebrar la solemne sesión de Toma de Posesión como Académica Extranjera de la Ilma. Sra. Dña. Magdalena Götz, del Ludwig-Maximilian-Universität München (LMU), Directora del Grupo Physiological Genomics, quien leyó su discurso titulado: "*Mechanisms of neurogenesis and neural repair*" (Mecanismos de neurogénesis y reparación neural). Fue presentada por la Académica de Número, la Excm. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal.

Del 22 al 26 de febrero tuvo lugar el curso sobre "MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LOS ANTICONCEPTIVOS", dirigido por el Académico de Número D. Bartolomé Ribas Ozonias, y fueron coordinadores los

Excmos. Sres. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de esta Real Corporación, y D. José Antonio Clavero Núñez, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina.

El primer día comenzó con la Introducción a cargo del Presidente de la RANF, D. Mariano Esteban Rodríguez, quien dio la bienvenida a los asistentes y disertó sobre los objetivos del curso. Después de las palabras del Director del mismo y sobre el rigor científico con que se explicará el temario por eminentes científicos y especialistas en los temas a tratar. A continuación el también Académico de Número, D. Federico Mayor Zaragoza, impartió la primera lección con el título: "LA EXPLOSIÓN DEMOGRÁFICA Y CONTROL DE LA NATALIDAD"; le siguió la conferencia sobre "ANTICONCEPTIVOS EN LA ADOLESCENCIA: ESTADO ACTUAL" del Prof. Dr. Pluvio Coronado Martín y la jornada finalizó con la conferencia "ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO GENITAL MASCULINO" del también Académico de Número D. Albino García Sacristán.

El día 23 contó con ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO GENITAL FEMENINO con el Dr. José Antonio Vidart Aragón continuó con ORIGEN Y DESARROLLO CELULAR DE LOS GAMETOS. GAMETOGENESIS. con el Dr. Benjamín Fernández Ruiz y la jornada terminó con MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE LA FERTILIZACIÓN a cargo del Dr. Bartolomé Ribas Ozonas.

El día 24 la jornada contó con la conferencia HORMONAS SEXUALES Y SU MECANISMO DE ACCIÓN a cargo de la Dra. Evangelina Palacios Aláiz y culminó con la extensa conferencia de ANTICONCEPTIVOS HORMONALES a cargo del Dr. Alfonso Domínguez- Gil Hurlé.

El día 25 comenzó con ANTICONCEPTIVOS NO HORMONALES Y VACUNA a cargo de la Dra. María Cascales Angosto; terminando con MÉTODOS BARRERA. LOS ANTICONCEPTIVOS A TRAVÉS DE LA HISTORIA a cargo del Dr. José Antonio Clavero Núñez.

El día 26 comenzó con la conferencia ESTERILIZACIÓN QUIRÚRGICA a cargo del Dr. Antonio González González; DISPOSITIVOS INTRAUTERINOS E INTRATUBÁRICOS con el Dr. Antonio González González y para finalizar el curso se expusieron las CONCLUSIONES DEL CURSO Y ENTREGA DE DIPLOMAS por el Dr. Bartolomé Ribas Ozonas, Director del Curso.

El 25 de febrero a las 19 horas la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF celebraron la Conferencia titulada: "*La biología de las quimioquinas y su papel en la regulación dinámica del tráfico leucocitario*" impartida por el Dr. Mario Mellado, Investigador científico del CSIC en el CNB/CSIC quien fue presentado por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Las quimioquinas son una familia de mediadores quimioatrayentes que por unión a receptores de siete regiones transmembrana acoplados a proteínas G dirigen el movimiento celular. Poseen un alto interés farmacológico ya que están implicadas en la homeostasis del sistema inmunológico y también en múltiples patologías relacionadas con procesos inflamatorios, como el asma y con enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, etc. También se las ha relacionado con la infección por el virus VIH-1, con las metástasis tumorales, y con el rechazo a trasplantes. Los receptores de quimioquinas sobre la superficie celular no son, como podría esperarse, entidades individuales que responden a la unión del ligando, son en realidad complejos formados por dos (homodímeros o heterodímeros) o más receptores (oligómeros). En realidad estos receptores, a pesar de su complejidad estructural, se organizan en conjuntos muy dinámicos, cuya composición y conformación se modifica por la expresión de otros receptores, de otras proteínas de membrana y por los niveles de ligando presentes en el entorno celular. Este mecanismo permite una modulación muy precisa de las propiedades farmacológicas del receptor, de la función del ligando, y de las rutas de señalización activadas. Estudios recientes empleando técnicas de súper-resolución demuestran que los receptores y sus conjuntos, no son proteínas estáticas en la membrana plasmática, en realidad difunden por la superficie lipídica y son capaces de coalescer en grupos mayores o separarse en entidades menores y ello afecta a su función final. Estos mecanismos permiten explicar conceptos como el umbral de respuesta que debe alcanzarse para obtener una completa función y observar como éste es modificado por la presencia de otros receptores/proteínas o por la composición de la membrana plasmática. Todas estas observaciones representan un mecanismo celular que aumenta la versatilidad de las quimioquinas y explica la gran variedad de funciones que se les atribuyen. El conocimiento de las interacciones de estos receptores y de su dinámica sobre la superficie celular es clave para poder diseñar herramientas que permitan intervenir en la función de las quimioquinas y abre nuevas posibilidades para el diseño de drogas que bloqueen o modulen el movimiento celular.

El 3 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la MESA REDONDA SOBRE EL BALNEARIO DE SAN NICOLÁS (ALMERÍA) contando con las siguientes ponencias:

Excma. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé, "*Historia y Generalidades*". Estudio, realizado por los Dres. M^a del Carmen Francés Causapé, Académica de Número, José López Guzmán, Académico Correspondiente, y María López González; se trata del Balneario de San Nicolás, situado en la calle Baños nº 2 de la población de Alhama de Almería, situado al Sur de la provincia de Almería, en la Alpujarra almeriense y el valle del río Andarax, en la Comunidad Autónoma de Andalucía. Se hace mención, entre las personalidades alhameñas, a D. José Artés de Arcos que en el siglo XX hizo

posible la recuperación del Balneario. Se aborda el estudio del entorno, destacando las particularidades de la Sierra de Gádor, los Parajes Naturales y el Parque Natural del Cabo de Gata-Níjar. Asimismo se comentan las noticias históricas acerca de la utilización de las aguas minero-medicinales del Balneario que ya eran conocidas por los romanos y los árabes, que alcanzaron gran renombre en los siglos XVIII, XIX y XX y que atraían a bastantes bañistas principalmente lugareños y de la propia provincia de Almería. Se hace referencia a la declaración pública de utilidad de las aguas del Balneario en 1877 gracias al análisis químico efectuado por el farmacéutico Gil Ramón Rodríguez, instalado con botica en la población, así como a la clasificación de sus aguas dependiendo de los diferentes análisis químicos realizados en los siglos XIX y XX. Se da cuenta de los Médicos Directores del Balneario hasta la actualidad que han sido responsables de aplicar las distintas técnicas hidroterápicas a los pacientes en sus instalaciones y a la acción terapéutica atribuida a las aguas del mismo. El microclima excepcional que goza la localidad de Alhama de Almería, sumado al trato exquisito de todo el personal, tanto en el Balneario como en el Hotel; hacen de este establecimiento un auténtico Centro de Salud que hace posible la recuperación de los pacientes y que estos vean atendida cualquier necesidad sea de carácter sanitario, turístico, cultural o lúdico.

Dra. Carmen de la Rosa Jorge disertó sobre: "*Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario*". Estudio realizado por las Dras. M^a del Carmen de la Rosa Jorge, Concepción Pintado García, Victoria Fernández García, Carmina Rodríguez Fernández. Se han estudiado los microorganismos autóctonos y alóctonos de las aguas mineromedicinales del Balneario San Nicolás, correspondientes a tres sondeos (Sillero, San Marcos y El Niño). El número de microorganismos totales está comprendido entre $6,9 \times 10^3$ y $8,1 \times 10^4$ y el porcentaje de vivos entre 30 y 91%. Se ha encontrado mayor número de bacterias oligotrofas que heterótrofas. El sondeo Sillero, utilizado principalmente en los tratamientos, presenta un número muy bajo de bacterias viables (<10 ufc/ml) que corresponden en su mayoría a cocos Gram positivos (93,3%) de la especie *Staphylococcus lugdunensis* (40%). El sondeo San Marcos tiene una mayor diversidad microbiana, predominando los bacilos Gram positivos de la especie *Bacillus licheniformis* (32,4%) y los bacilos Gram negativos especie *Cupriavidus pauculus* (16,2%). En el sondeo El Niño son mayoritarios los bacilos Gram negativos (65,8%) y la especie *Pseudomonas aeruginosa* (26,3%). En todas las muestras se han detectado microorganismos proteolíticos, amilolíticos, nitrificantes y amonificantes, así como bacterias halófilas y del hierro. Ninguna muestra presenta bacterias patógenas ni indicadores fecales. También se han estudiado los biotapetes formados en las fuentes utilizadas para bebida, constituidos por una asociación de cianobacterias filamentosas y esféricas, así como del alga *Cosmarium*.

Dra. Esperanza Torija Isasa disertó sobre: "*Estudio físico-químico de las aguas del Balneario*". Las aguas del balneario de San Nicolás, de Alhama de Almería, fueron declaradas de utilidad pública por *Real Orden de 16 de mayo de 1877*, bajo la denominación de aguas de Alhama de la Seca; en 1928 fue confirmada la utilidad pública de las aguas minero-medicinales de Alhama de Almería. Se trata de aguas hipertermales, que surgen a una T de 48°C; su pH es cercano a 8. Se caracterizan por su mineralización media, con un residuo seco, a 180°C, superior a 600 mg/l, si bien su conductividad (800 μ S/cm) permitiría aproximarlas a aguas consideradas de mineralización importante, según Rodier. La dureza, cercana a 500 mg/l de CaCO₃, indica que se trata de aguas muy duras, en las que domina el calcio con contenidos ligeramente superiores a 100 mg/l. De los aniones, sulfatos y bicarbonatos son mayoritarios, con valores próximos o ligeramente superiores a los 200 mg/l. Por los análisis realizados se pueden considerar aguas hipertermales, de mineralización media y muy duras.

Dres. Daniel Sánchez-Mata y Miguel Ladero Álvarez intervinieron informándonos sobre: "*Estudio sobre la Vegetación del Entorno de las Aguas del Balneario*". El Balneario de San Nicolás se encuentra en el municipio almeriense de Alhama de Almería ubicado en la vertiente septentrional de la Sierra de Gádor y orientado hacia la amplia rambla del río Andarax. Esta localización geográfica hace de este territorio una auténtica encrucijada biogeográfica entre los territorios murciano-almerienses y los genuinamente béticos de carácter orófilo. Se encuentra en el LIC - Natura 2000 de Sierras de Gádor y Enix en un área carente aún del nivel de protección adecuado. La Sierra de Gádor y sus estribaciones en Enix (Morrón, 2242 m) constituyen una formación geológica constituida, básicamente, por materiales carbonatados (calizas y dolomías) emergidos durante la Orogenia Alpina que fueron alterados por procesos de origen volcánico e hidrotermal. De este pasado geológico procede la riqueza mineral del área en depósitos de plomo, zinc, plata y azufre explotados desde la antigüedad. La vegetación natural de Gádor se encuentra fuertemente alterada por la secular actividad humana. La deforestación ha sido generalizada salvo pequeños enclaves y barrancos donde se refugian rodales forestales de quejigos y arces (*Daphno latifoliae-Aceretum granatensis*); además existen numerosas repoblaciones con diversas estirpes de pinos en todo el área montañosa. La catena altitudinal de vegetación natural incluye comunidades seriales oromediterráneas de grandes caméfitos espinosos (*Festuco hystricis-Astragaletum granatensis*) extendidas por las áreas cacuminales así como numerosas etapas secundarias correspondientes a la sustitución de las etapas maduras de encinares supramediterráneos (*Berberido hispanicae-Quercetum rotundifoliae*), mesomediterráneos (*Paeonio coriacea-Quercetum rotundifoliae*) y, en la vertiente meridional, termomediterráneos (*Smilaco mauritanicae-Quercetum rotundifoliae*). En cuanto a la flora destacaron en su intervención que la existencia de un nutrido conjunto de taxones considerados como endemismos gadorenses; además existen tanto elementos florísticos murciano-almerienses como orófilos béticos de excepcional interés.

El 10 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la MESA REDONDA titulada "EDICIÓN GENÓMICA". Fue coordinada por el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón, Académico de Número de la RANF. Contó con las ponencias de el Dr. Lluís Montoliu José del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC: "*La técnica CRISPR-Cas9: Fundamentos y aplicaciones*" y el Excmo. Sr. D.

Juan-Ramón Lacadena Calero Académico de Número de la RANF disertó sobre: "La técnica CRISPR-Cas9: Ciencia y ética".

El 17 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF celebraron la Conferencia titulada "TENIOSIS/CISTICERCOSIS: NUEVAS SOLUCIONES A UN VIEJO PROBLEMA" impartida por la Dra. Dña. Teresa Gárate Ormaechea, Jefe del Servicio de Parasitología en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, quien fue presentada por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

La Dra. Teresa Gárate es una eminente científica, directora de numerosas tesis doctorales y con una destacada línea investigadora de aplicación sanitaria. Su perfil investigador se ha estructurado a través del entrenamiento en Parasitología clásica y molecular aplicada al control de helmintosis varias. Ha trabajado en onchocercosis y otras filariosis, triquinosis, anisakiosis, cisticercosis, y fasciolosis, desarrollando herramientas diagnósticas (sondas DNA, antígenos recombinantes, protocolos amplificación...). También interesada en la caracterización molecular de antígenos de actividad protectora, con el objetivo último de preparar vacunas eficaces contra algunas de las parasitosis citadas, así como en el estudio de otras moléculas relevantes en la biología de dichos parásitos.

En su intervención, la Dra. Gárate nos habló sobre la *Taenia solium*, cestodo de gran relevancia clínica y veterinaria, que es el origen de la teniosis y la cisticercosis humana, además de producir la cisticercosis porcina. Estas parasitosis son zoonosis desatendidas, endémicas en las zonas más pobres de países en desarrollo de América, África y Asia, que los fenómenos de inmigración han importado a otras regiones en las que se había conseguido su eliminación a comienzos del siglo XX.

La biología del ténido se mantiene entre los dos hospedadores citados. El humano adquiere la teniosis por consumo de carne de cerdo, cruda o poco cocinada, con larvas (cisticercos) viables. La evaginación de los cisticercos en el intestino conduce al desarrollo del adulto, y la eliminación en las heces de las formas de transmisión de la cisticercosis porcina y humana, proglótides grávidas y huevos. Tras su ingestión y digestión, se produce la liberación y activación de los embriones contenidos en los huevos (oncosferas), que invaden la pared intestinal y migran a diferentes órganos y tejidos, en los que evolucionan a cisticercos. En el humano, el parásito coloniza especialmente el tejido subcutáneo, muscular, ojo y sistema nervioso central; es en esta última localización donde ocasiona la patología más grave, la neurocisticercosis (NCC).

La NCC es una enfermedad pleomórfica y heterogénea, con un diagnóstico y tratamiento complejos. Se trata de la parasitosis neurológica más frecuente y causa alrededor del 30% de los cuadros de epilepsia que se detectan en las áreas endémicas cuando la enfermedad es sintomática; por otra parte, la cisticercosis ocasiona pérdidas económicas cuantiosas en la cría del cerdo. El impacto de la zoonosis es tan relevante en el desarrollo socio-económico de las comunidades afectadas que, en la actualidad, se están llevando a cabo diferentes iniciativas para abordar su posible control. En este sentido, en los países endémicos, la implementación de medidas higiénico-sanitarias básicas, junto con programas educativos, no han resultado tan eficaces como había ocurrido previamente en otras regiones. De ahí, que se estén buscando alternativas complementarias para mejorar el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad y desarrollar vacunas que interrumpan su transmisión con el objetivo de evitar la teniasis intestinal humana, origen de todos los problemas.

En la presentación se discutieron los avances llevados a cabo en el estudio molecular de *T. solium* así como en el análisis de la respuesta que desencadena en el paciente. Los nuevos desarrollos, basados en el conocimiento del cestodo y establecimiento de biomarcadores de diagnóstico, pueden conducir al control/eliminación de la zoonosis, un problema ancestral de los seres humanos.

El 31 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la MESA REDONDA titulada "*El farmacéutico pieza clave en la atención socio-sanitaria. Situación actual y perspectivas de futuro*". La Presentación – Coordinación corrió a cargo de la Excm. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Participaron como Ponentes el Ilmo. Sr. D. Luis J. González Díez, Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, el Ilmo. Sr. D. Jesús Aguilar Santamaría, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos fue sustituido por D. Luis Amaro su Secretario General; y la Ilma. Sra. D^a Carmen Peña López, Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y Presidenta de la Federación Internacional de Farmacéuticos (FIP).

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar:

La Real Academia Nacional de Farmacia felicita con orgullo a nuestra Académica Excm. Sra. Dña. María Vallet Regí, al haber obtenido una ERC- Advanced Grant, del Consejo Europeo de Investigación. Con esta cualificación, se une al grupo cercano a diez investigadores españoles que cada año acceden a estas prestigiosas y exigentes Ayudas. Su proyecto ha sido elegido de entre unas 2.000 solicitudes presentadas, y evaluada por ocho destacados científicos internacionales, que se han mostrado impresionados por los logros investigadores de la Prof. María Vallet Regí, en el desarrollo de nanopartículas de sílice mesoporosa para aplicaciones médicas, campo en la que la consideran, sin ninguna duda, pionera y líder internacional.

Además de miembro de la Real Academia Nacional de Farmacia, es profesora de la Universidad Complutense de Madrid y miembro del CIBER-BBN y del Instituto de Investigación i+12, con el tema financiado: "*Nanosistema mesoporoso polivalente para enfermedades del hueso*" programa Marco Horizon 2020.

Asimismo, se ha considerado de impacto, la perspectiva de tratar el cáncer, la infección ósea y la osteoporosis, con nanopartículas mesoporosas cargadas con fármacos, liberan su principio activo en respuesta a estímulos específicos.

En nombre de todos los Académicos felicitamos a nuestra compañera María Vallet Regí por prestigiar y proporcionar brillo y esplendor a la Real Academia Nacional de Farmacia.

La Real Academia de Farmacia ha albergado y participado en sesiones y actos extraordinarios relevantes para el mundo de la ciencia y la investigación.

El pasado 2 de febrero la RANF abrió el debate sobre la humanización de la asistencia sanitaria. Figuras de la profesión farmacéutica, la Administración autonómica, la investigación y la Medicina han reflexionado, en el marco de una jornada científica que tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF), sobre las actuales corrientes que buscan un trato más humano en la asistencia sanitaria, coincidiendo todas ellas en que todavía queda mucho por hacer en este terreno.

Acudieron al encuentro, que contó con el patrocinio de la farmacéutica Astellas, Vicente Arias Díaz (FIDAP), Eduardo Rodríguez Rovira (Fundación Edad & Vida), Ángel Puente (COGESA, Círculo de la Sanidad), José Vicente Galindo (Esteve), José Samblás, (Grupo IMO), Salvador Arribas (SEIS, Fundación Bamberg), Paloma Delgado (Novartis) y Luis González (COFM), entre otros. Honorio Carlos Bando, Jesús Sánchez Martos, Mariano Esteban Rodríguez y Asunción Somoza.

En la selva nacional de los observatorios, los sofistas de lo sano y los consejos de expertos que actúan como notarios de una inactividad más o menos disimulada, ha hecho fortuna el término humanización como marchamo y futuro de la calidad en la asistencia sanitaria. Este martes, 26 de enero, la nave central de la Real Academia Nacional de Farmacia se convirtió en faro de debate sobre este interesante asunto, contando con diferentes puntos de vista dentro del mundo de la salud. Sin embargo, sobraron ejemplos de fallos en la humanización dentro del espacio asistencial, al tiempo que faltaron más ejemplos de buenas medidas encaminadas a ofrecer a los pacientes un trato más humano. Entre estas últimas se pudo contar el acierto de permitir que algún familiar acompañe a la persona que acude a los servicios de urgencias junto a otras medidas de ese tipo que están en desarrollo en la Comunidad de Madrid.

Por el contrario, algunos de los propios ponentes refirieron situaciones en las que hubo de todo menos trato humano o al menos faltó una buena actitud ante los problemas de los ciudadanos. Fue el caso, por ejemplo, del consejero de Sanidad de la Comunidad de Madrid, quien aseguró que tuvo que recorrer media Capital para que le explicaran por qué tenía que comprarse una caja de 40 comprimidos cuando su tratamiento estaba fijado en 28 pastillas. O el caso del director general de Coordinación de la Atención al Ciudadano y Humanización de la Asistencia, Julio Zarco, que tuvo que amenazar el pasado verano con certificar él mismo la defunción de un familiar directo ante la demora o la ausencia del intensivista de turno, durante tres horas y media. Sobre ello abundó también el presidente de la Fundación Bamberg, Ignacio Para, quien tuvo que lamentar el contexto de jaleo y jolgorio que tuvo que soportar en una UCI, tras una intervención quirúrgica de importancia.

La Subdirectora General del Instituto de Salud Carlos III, Victoria Ureña, ofreció su opinión de que ni la retórica comercial ni la instrumentalización política empañen términos tan saludables y éticamente necesarios como humanización y calidad asistencial. Para la ponente ambas son las caras de una misma moneda. Según sus palabras, la humanización es el reconocimiento de la dignidad intrínseca de todo ser humano en todas sus dimensiones y atributos, mientras que la calidad tiene muchas dimensiones y busca satisfacer las necesidades implícitas y expresadas de las personas. Contando para ello con cualidades claramente diferenciadas. Accesibilidad, o la facilidad a la hora de recibir atención sanitaria sin estorbo de barreras organizativas, geográficas, socio-económicas y culturales. La Efectividad, como el grado de éxito al lograr beneficio alcanzables, teniendo en cuenta que el paciente debe tener siempre una actitud lo suficientemente activa respecto a su salud.

También es un rasgo esencial de la calidad asistencial la Seguridad, teniendo en cuenta que en España se calcula que hay tres muertes prevenibles por cada 1000 ingresos hospitalarios. La Eficiencia, que exige no gastar de menos ni de más. La Continuidad asistencial, amenazada muchas veces por la alta de comunicación entre profesionales y que necesita tener en cuenta la importancia de los cuidadores de las familias de los pacientes. Y, finalmente la Satisfacción, tanto de pacientes como de profesionales, verdaderos expertos y jueces en lo que a humanización de la asistencia se refiere.

El consejero de Sanidad de la Comunidad de Madrid, Jesús Sánchez Martos, enumeró las tres premisas de su ejecutoria pública: actitud, compromiso y lealtad. Dentro de esas líneas de demarcación, la humanización debe ser un valor a incrementar cada día, empezando por dar a los pacientes una información completa y comprensible de su proceso patológico y asistencial, señaló. Además, y como nuevas etapas dentro de esta nueva filosofía organizativa, Sánchez Martos mencionó la figura del facilitador de duelo, a la hora de dar malas noticias y el proyecto destinado a que los usuarios de las urgencias puedan disponer de aparcamiento gratuito mientras esperan a ser atendidos.

Especialmente entusiasta se mostró Julio Zarco, quien entre bromas y veras comentó que al principio de su responsabilidad política algunos le llamaron jocosamente "Humanizador". Según su argumentación, el término "paciente" debe ceder el sitio a otro concepto más amplio de "ciudadano". Evocó Zarco la figura de Pedro Laín Entralgo, quien siempre consideró un desafío necesario aplicar las humanidades a la práctica clínica.

Como novedades el director general citó las nuevas formas de acompañar a los ciudadanos cuando enferman, utilizando

atención psicosocial y protocolos especiales cuando la persona entra en el sistema o cuando se aproxima al final de su vida. Siendo también algunos de sus proyectos la formalización de un Observatorio de la Humanización y la puesta en marcha antes de Semana Santa de una Escuela para Pacientes. En cuanto al observatorio, el director general anunció que se formularán indicadores de humanización cuyo cumplimiento por los centros asistenciales será recogido contractual y presupuestariamente.

Para estas y otras medidas, Zarco se prescribió a sí mismo buenas dosis de paciencia, ya que, según aseveró, las cosas están tan politizadas en Madrid que hay que explicarlas cinco veces más que en otras comunidades autónomas. Y aun así, existe el riesgo "de que se te echen encima", según afirmó.

Finalmente, las exposiciones fueron completadas por la visión que dio de la Farmacia Hospitalaria el presidente de la SEFH, Miguel Ángel Calleja. Según razonó existen algunas amenazas para la debatida humanización, tales como la dependencia excesiva de la tecnología y la robotización, la superespecialización, tan necesaria como limitadora y la falta de cercanía entre farmacéuticos hospitalarios y pacientes. Algo de gran trascendencia, si se tienen en cuenta problemas de alcance nacional como la falta de adherencia a los tratamientos.

Otra noticia de interés es el pacto de estado por la educación que tuvo lugar el jueves, 11 de febrero. El Instituto de España -integrado por las ocho Reales Academias españolas. Ha exigido, por primera vez, un Pacto de Estado para la Educación, "inaplazable" y "urgente", ante la "volatilidad" de la legislación en materia educativa durante los treinta años de la democracia en España.

"Las circunstancias del país nos obligan a reclamar este pacto", ha afirmado el Presidente del Instituto de España, Joaquín Poch Broto, también Presidente de la Real Academia de Medicina durante el acto de presentación de esta iniciativa. Le han acompañado los dirigentes de las Reales Academias de la Lengua Española, de Historia, de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y de Ciencias Morales y Políticas, de Jurisprudencia y Legislación y la de Farmacia, representada por nuestro Presidente, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

El 25 de febrero La RANF y MSD firmaron un Convenio marco de colaboración para el fomento de la investigación y la formación en ciencia. D. Mariano Esteban, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, y Dña. Regina Revilla, directora ejecutiva de Policy, Communication & Corporate Affairs de Merck, Sharp & Dohme (MSD) en España, han firmado el acuerdo en la sede de la RANF. El acuerdo cristaliza así el trabajo realizado por el grupo formado por D. Mariano Esteban, Dña. Regina Revilla, D. Bartolomé Ribas, D. Fidel Ortega, D. Honorio C. Bando y D. Augusto Silva, quienes también asistieron a la firma. Con el objetivo de crear un marco de actuación favorable para el desarrollo de actividades en el ámbito de la investigación, la formación científica y la educación sanitaria, la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) y la compañía biofarmacéutica MSD, se comprometen al fomento y desarrollo de la investigación y formación en el ambiente farmacéutico y sanitario de España.

Este acuerdo incide también para fomentar el conocimiento sobre los avances que la ciencia está aportando sobre nuevos fármacos con alta especificidad sobre el organismo, en línea con los objetivos de la RANF -como institución pública y de MSD, como empresa de llevar a cabo investigaciones y aplicaciones de los medicamentos en salud, junto con la responsabilidad que ambas instituciones ejercen en la difusión de la ciencia," ha destacado Mariano Esteban, presidente de la RANF, durante la celebración del acto de firma del convenio, que tiene en principio una duración de dos años, prorrogable.

Por su parte, Regina Revilla, directora ejecutiva de Policy, Communication & Corporate Affairs de MSD en España, ha destacado cómo la Real Academia, cuyo origen se remonta al siglo XVIII, ha sabido "compaginar su experiencia, basada en los numerosos académicos asociados a esta institución, con una total modernidad a través de reuniones y seminarios de salud y ciencia de enorme actualidad e interés para los académicos, los farmacéuticos y el público en general".

De todo lo acabado de exponer, y en Memorias precedentes, se observa que, en los últimos años, esta institución ha organizado en su sede numerosas conferencias y mesas redondas con expertos en temas de máxima actualidad como, por ejemplo, los fármacos biosimilares, la inmunoterapia en cáncer, las resistencias antibióticas, las enfermedades infecciosas o las vacunas. Ahora, la organización de estos encuentros bajo el marco de colaboración con MSD permitirá "incrementar la colaboración público-privada, ya que todos perseguimos el mismo objetivo de mejora de la salud y calidad de vida de los ciudadanos", ha explicado Mariano Esteban. "Un objetivo, el de vivir más y mejor, que concuerda plenamente también con la filosofía de MSD desde su nacimiento, hace ya más de 125 años", ha apuntado Regina Revilla.

Además de la organización de jornadas y mesas redondas sobre diferentes temas, el documento acabado de firmar por ambas entidades, destaca la posible colaboración de ambas en otros ámbitos como la ejecución conjunta de proyectos y programas de investigación, formación y mejora de la gestión; el asesoramiento mutuo en cuestiones relacionadas con la actividad de ambas entidades; la organización y ejecución de actividades comunes relacionadas con la investigación y el desarrollo tecnológico y la promoción social de la educación o cualquier otra actividad de fomento de la investigación.

Por parte de la RANF, tiene como principales funciones, el fomentar la investigación y el estudio de las Ciencias Farmacéuticas y sus afines; asesorar al Gobierno de la Nación, Administraciones públicas, Organismos públicos, como la Agencia Española del Medicamento, agencias científicas y tecnológicas y a cuantas instituciones públicas o privadas lo soliciten, en todo lo que se refiera a las Ciencias Farmacéuticas y al Medicamento, y cuanto se relacione con ellas y con la

promoción de la Salud; y elaborar informes o dictámenes sobre las materias que le son propias.

MSD contribuye a la salud mundial, es una marca de Merck & Co., Inc., con sede central en Kenilworth, (Nueva Jersey, Estados Unidos). Mediante sus medicamentos, vacunas, terapias biológicas y productos veterinarios, aconsejan a sus clientes operando en más de 140 países para ofrecer soluciones innovadoras de salud. También muestran su compromiso para incrementar el acceso a los servicios de salud a través de políticas de gran alcance, programas y colaboraciones.

El pasado 29 de febrero el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé publicó un libro del que es coautor sobre “*Medicamentos falsificados*”, que está colgado en nuestra red.

La Real Academia Nacional de Farmacia lamenta el fallecimiento del Dr. D. Antonio Fermín Mestre Barceló, el pasado 17 de febrero a la edad de 63 años.

El Dr. Mestre, ingeniero de caminos y Jefe del Área de Climatología y Aplicaciones Operativas de la Agencia Estatal de Meteorología y miembro de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales de la Real Academia Nacional de Farmacia en calidad de representante de la Agencia Estatal de Meteorología desde el año 2013. Era un gran experto en climatología, habiendo colaborado con esta Real Academia en los estudios realizados sobre los Balnearios de la Villa de Olmedo (Valladolid), de Villavieja (Castellón) y San Nicolás (Almería). Desde esta tribuna enviamos nuestro más sentido pésame a su familia, de parte de la Comisión de Aguas, Junta de Gobierno y Académicos que compartían inquietudes y trabajo.

Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario RANF