

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



Volumen. 83, Número 5 - Mayo - Agosto dtg (2017)



My work at the RANF. What is the cultural job of academies? Should they have a larger exposure? Does our country make the most of them? Are professors in this country selected and treated as they deserve?

Title in Spanish: *Mi trabajo en la RANF. ¿Qué labor cultural hacen las Academias, se debería ampliar su difusión, se utiliza al máximo? ¿Son los enseñantes de este país elegidos y tratados como merecen?*

Ana M.^a Pascual-Leone Pascual¹

¹ Investigadora del CSIC y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

* **Corresponding Author:** anamariapascualleone@gmail.com *An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 3 (2017), pp. 305-312*

Received: November 6, 2017 **Accepted:** November 6, 2017

Language of Manuscript: Spanish

Hace aproximadamente veinte años que pertenezco a la RANF, primero, unos cinco años, como Académica Correspondiente, estando en activo como investigadora del CSIC, y luego quince, ya jubilada, como Académica de Número, en los que, además, fui elegida por votación Vicepresidenta de esa Academia en 2007. Sé bien, pues, desde dentro, la gran labor divulgativa que se hace y lo poco que se difunde en el país y en los medios de comunicación estatales. A pesar de estar informatizada la Academia con retransmisión simultánea de sus sesiones. Lo que nos lleva al escaso reflejo social que tienen las Academias y que no pueden ampliar por su deficiente soporte económico. Todo ello es un gran error en un momento en que comenzamos, según parece, a querer elevar el nivel educativo de la sociedad.

No encuentro la manera de plasmar la labor de la RANF con objetividad y con rigor si no me refiero a mis propias publicaciones en sus Anales. De conferencias dadas y monografías coordinadas y publicadas, o en las Tertulias impartidas y Mesas Redondas organizadas sobre diferentes temas. Quisiera con todo ello mostrar el cómo y el porqué del contenido de la labor en la Academia y cómo, además, el contenido de los temas divulgados va cambiando sin casi preverlo los académicos, ya que los temas tratados son elegidos y modelados por el devenir de su interés y actualidad en cada momento. Lo expongo como ejemplo de lo que sucede, con toda seguridad, en la labor realizada por cualquier académico y con el único afán de poder transmitir cual es la importancia de este trabajo. Por qué se hace y para qué. Finalmente, quisiera exponer, según mi criterio, si esta labor divulgativa se podría aprovechar más en nuestro país.

Intento comunicar mi labor, a la cual se puede llegar por las citas que adjunto, para dar rigor a mis palabras, para que sea una muestra comprobable, que es, además, la única que puedo ofrecer y tengo derecho a mostrar. Simplemente como molde a través del cual se comprenda el trabajo cultural cambiante y variado de las Academias. No pretendo ser

exhaustiva en mi exposición ya que no lo hago, en absoluto, con fines exhibicionistas y, además, porque esta labor, aunque conocida por los integrantes de la RANF, sí puede servir de pauta para mostrar la labor de las Academias a nuestra sociedad civil.

Mi condición de Investigadora del CSIC, adscrita a un Centro Mixto CSIC-UCM, el Instituto de Bioquímica, me facilitó la colaboración con la RANF porque D. Ángel Santos Ruiz era Presidente de la RANF y Director del Instituto de Bioquímica. Así que, invitada por él, mi colaboración con la RANF empezó mucho antes de ser Académica Correspondiente de ella, lo cual no tuvo lugar hasta el 7 de Noviembre de 1996 presentada por el Académico de Número Dr. D. Octavio Carpena.

En mi vida activa jamás pensé en ser académico, entre otras cosas, tenía demasiado trabajo en formar mi grupo de investigación de "Metabolismo y Endocrinología Perinatal en el desarrollo de mamíferos", ya que en dicho Centro, cuando yo me incorporé en 1970, todos trabajaban en Bioquímica Vegetal. Tuve, con la ayuda de D. Ángel, que montar un criadero de animales que no existía y del que, finalmente, muchos se beneficiaron pasándose a trabajar en Bioquímica Animal. Era ya Investigador Científico del CSIC cuando llegué a Madrid. Había permanecido más de tres años en París, después de mi Tesis, tenía un Diploma de Estudios Superiores por la Sorbona, y me había formado en neonatología, en vertiente endocrina, en la Facultad de Ciencias de París, en el Departamento que dirigía el Dr. Alfred Jost, uno de los padres de la endocrinología fetal. Mi tema de investigación básica tenía, pues, como vertiente clínica, la prevención de la subnormalidad y trabajábamos en fetos y en neonatos en modelos animales, fundamentalmente, en rata.

MI LABOR, ANTES Y DESPUÉS, DE SER ACADÉMICO CORRESPONDIENTE

En 1976 ya publiqué un trabajo en los Anales de la

RANF: F. Escrivá y A. M. Pascual-Leone “Estudio de las variaciones de la insulina plasmática y proteínas cerebrales solubles en ratas neonatales normales y tirotoxicósicas”, *Anales Real Academia de Farmacia*, XII n° 2 (1976), (Trabajo "Premio Alter) y para F. Escrivá era uno de sus primeros resultados en nuestro laboratorio, y ahora acaba de ser nombrado Catedrático de Bioquímica de la UCM para satisfacción de todo nuestro grupo. En 1979 publicamos E. Besa y A. M. Pascual-Leone en *Anales Real Academia Farmacia*. 45:567-580 (1979), “Efecto de pequeñas dosis de tiroxina sobre el TSH hipofisario en rata tirotoxicósica”. Y en 1982 M. I. Aránguez y A. M. Pascual-Leone, “Consecuencias sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos de la administración de cortisol a rata perinatal”, *Anales Real Academia Farmacia*. 48:239-252 (1982). Dada la colaboración de mi grupo con laboratorios franceses se hicieron muchas invitaciones desde la RANF, siendo Secretario perpetuo de la Academia, el desgraciadamente recientemente fallecido, Dr. Ortega Mata que ya, entonces, era Académico de Número. Invitaciones de la RANF hechas a través de la Embajada de Francia para conferencias y cursos¹. Nuestro grupo de investigación tuvo aquellos años premios significativos². Y en 1996 entré a formar parte de la Academia como Correspondiente.

Debí jubilarme en 1995 con 65 años, eso decía la ley vigente para los investigadores, pero el Consejo Superior de Investigaciones Científicas me concedió el título *ad honorem* después de la evaluación de mi carrera científica por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología del Ministerio y por el área de Biomedicina del CSIC. y seguí trabajando jubilada. Y en 1997 fui contratada por parte del CSIC para continuar la carrera científica (contratación tan sólo concedida aquel año al 23% de jubilados, 18 personas, después de su evaluación científica). Era Presidente del CSIC, el Dr. D. César Nombela Cano. Todo ello para tratar de mantener a los investigadores mayores de 65 años en condiciones económicas parecidas, pero no igualitarias, a los docentes universitarios que se jubilaban a los 70 años. Mantuve mi contrato hasta el año 2000 en que dejé el laboratorio. Expongo estas cuestiones, totalmente comprobables, para evidenciar la falta de valoración y apoyo que ha tenido siempre, en nuestro país, el trabajo de investigación básica y sin el cual el mundo del siglo XXI, de ninguna forma, podría haber alcanzado el nivel cultural que tienen las sociedades en todos los países, ni tampoco las condiciones sanitarias y terapéuticas si nos ceñimos a la investigación básica biomédica.

Naturalmente, en esos años, estando en activo, mis aportaciones a la RANF y los premios concedidos tuvieron como temática las investigaciones que se estaban realizando en mi grupo de trabajo, mostrábamos los resultados que obteníamos y sus conclusiones³. Y parte de dicha temática investigadora está expuesta en el libro que coordiné publicado en 2012⁴ del cual hablaremos.

LABOR EN LA RANF SIENDO ACADEMICO DE NÚMERO

Pero el 13 de diciembre de 2001, ya jubilada, fui nombrada Académico de Número por votación de los

Académicos de la RANF, leyendo el discurso titulado “*Visión endocrina actual de las interconexiones celulares : la familia de la insulina*” y que fue publicado por la Academia.

El contenido de éste discurso trata, por primera vez en mis intervenciones, de enmarcar las investigaciones que había realizado dentro de un cuadro más amplio. Intentando exponer las conexiones de nuestro tema de investigación con la ciencia vigente entonces, con las teorías y conclusiones científicas del año 2001. El discurso es una reflexión divulgativa, derivada de los resultados de investigación encontrados y del bagaje adquirido en los treinta años de trabajo investigador Y así he continuado siempre en la RANF, tratando de actualizar conocimientos en vertientes que eran interesantes para la formación adquirida en mi etapa activa, buscando descubrimientos que muchos de ellos no existían aún mientras yo investigaba. Queriendo así divulgar, pues, lo nuevo, lo que no existe en libros de texto, lo que uno mismo tiene que aprender en revisiones científicas lo más rigurosas posibles. En primer lugar, porque eso es un enriquecimiento personal que se debe uno a sí mismo, pero, además, que solamente se puede hacer cuando se tiene experiencia científica, no improvisada, sino labrada a través de años de trabajo. Ese es, además, sin duda, el hacer científico de los miembros en las Academias. No se puede hacer antes, forzosamente es una vertiente cultural que no puede hacer un joven, pero que culturalmente es muy enriquecedora si se divulga y se traslada a la sociedad y que siempre se refleja en las generaciones más jóvenes. La intergeneracionalidad es absolutamente necesaria para crear en un país un nivel alto de cultura. Y, como veremos, dicho interés por la intergeneracionalidad siempre ha movido también mi trabajo en la Academia.

RELATO CONCRETO DE LOS ÚLTIMOS 15 AÑOS DE ACADEMICO DE NÚMERO

Los últimos años antes de la jubilación, y los primeros después del 2000, fueron años de mucho trabajo. Porque para un investigador de mi generación, generación de postguerra civil, que había conseguido tener dinero y proyectos a su nombre y para su tema, tan solo a partir del año 1980, aproximadamente, su posibilidad de resultados brillantes publicados en revistas de alto impacto se reducía tan solo a algo más de veinte años escasos. Y si ya la vida humana es corta siempre en un investigador porque se requieren muchos años de preparación, en dichas circunstancias, muy corrientes en aquellos años para mucha gente, su vida productiva es cortísima. El investigador tiene la sensación, al menos yo la tuve, de que se jubila cuando está mejor formado y cuando, su creatividad y posibilidades de publicar, están en alza. Digo todo ello para destacar el error enorme que se comete en los países cuando de forma importante se limita el dinero para la investigación, porque ello aumenta, exageradamente, el esfuerzo a realizar del investigador en sus comienzos y ese tiempo perdido es ya irrecuperable para él y para su país.

Por estas circunstancias, los años antes de la jubilación y los siguientes hubo que redactar y publicar muchos resultados que estaban no publicados aún⁵. No obstante, estaba jubilada y aproveché mi tiempo en la Academia.

My work at the RANF. What is the cultural job of academies?

Hubo posibilidad de seguir participando en cursos de doctorado en distintas universidades. Uno muy importante para los investigadores perinatalistas de este país fue sobre “Bioquímica Perinatal”, que se realizó por espacio de más de doce años, coordinado y dirigido por el catedrático Emilio Herrera, curso modelo de dedicación y buen hacer en su dirección, Ya que nos permitía además, en muy buen clima intelectual, conocernos e intercambiar ideas los perinatalistas del país. El curso fue subvencionado siempre por la Fundación Areces. También intervine en Tertulias científicas sobre temas interesantes como el dimorfismo sexual, cuyo proceso en humano tiene lugar en periodo fetal⁶ y que debe divulgarse para poder luego los ciudadanos lanzar opiniones en la sociedad con basamento científico

En las Tertulias de la RANF de un tema de actualidad se discute durante una hora después de la exposición de un ponente previamente elegido. Fue una idea para nuestra Academia de nuestro compañero el Dr. Antonio Martínez Fernández, Catedrático de Parasitología, y cuya idea ha venido proporcionando riqueza intelectual interesante.

Naturalmente, los Académicos dan también conferencias en otras instituciones, como hice yo en la Academia de Farmacia Catalana⁷ y en diversas universidades y cursos de doctorado. En la Academia catalana, finalmente, entré como Académico Correspondiente.

Mis intereses en la RANF se dirigieron, en primer lugar, a divulgar investigaciones de última hora acerca del control del apetito por el cerebro y la importancia en ello de hormonas como la insulina, ya que dicha cuestión es fundamental para comprender el equilibrio energético como fundamento de la salud y del crecimiento en etapas perinatales. Sobre todo, para un investigador interesado en modelos de malnutrición en periodo gestante, como yo había sido.

En el año 2005⁸ se publicó la primera monografía que coordiné, se titulaba “*Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías*” que fue enteramente subvencionada por la RANF. Y en donde el título de mi capítulo habla por sí solo “Control neuroendocrino del balance energético: el adipocito secretor” Y me rodeé, para los diferentes capítulos, de investigadores, catedráticos o pertenecientes al CSIC, que me parecían verdaderamente interesados en estos temas y que estaban trabajando en ellos. Como Adolfo Toledano, Guillermo Sáez, M^a Jesús Obregón, Gabriela Morreale, J. M. Cuezva, Federico Mayor Menéndez, Marta Casado o Fernando Escrivá y Carmen Álvarez de mi propio grupo. La selección de colaboradores en una monografía es fácil hacerla cuando uno ha trabajado entre ellos y ha implicado toda su vida en su trabajo. Solamente así se pueden seleccionar bien los colaboradores. La monografía fue publicada en 2005. Y sobre esta misma temática se habían dado varias conferencias, con trabajo propio, publicadas en los Anales o como invitada en otros Centros y que fueron publicadas en la RANF más tarde⁹.

En 2006, la Junta de Gobierno de la Facultad de Farmacia me concedió la Medalla de Oro de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense donde, en su

Instituto de Bioquímica, había realizado mis investigaciones por espacio de más de treinta años, lo cual fue muy gratificante. Siendo el Decano de la Facultad el Dr. D. Benito del Castillo actual Vicepresidente de la RANF. Pero también en 2006 se publicó una nueva monografía¹⁰ que fue el resultado de un curso dado en el Instituto de España “*Procesos Epigenéticos: postformación y factores externos*” mi capítulo se titula “Desarrollo fetal y neonatal”, en donde se habla de la influencia de factores externos en el desarrollo que influyen sobre el genoma heredado y dan como resultado un genoma modificado o *epigenoma* que es el que, finalmente, rige el desarrollo. Colaboraron Antonio Ferraz, Académico de la Academia Internacional de Historia de las Ciencias y catedrático de Filosofía en la UAM, desde un punto de vista filosófico, Flora de Pablo, Académico Correspondiente de la RANF, que habló de “Desarrollo embrionario temprano” y González de Posada, Académico de Número de Medicina y Correspondiente de la RANF desde un punto de vista físico y cosmológico. Esta monografía trata de incidir y expandir el concepto de epigénesis, enormemente en alza en esos años, sobre todo, por los estudios realizados con fines terapéuticos en procesos cancerígenos. Y este concepto es muy importante para los estudios de crecimiento perinatal que habíamos siempre realizado en mi grupo. Ello hizo, además, que a partir del 2008, estudiados los nuevos conocimientos publicados sobre epigénesis, me comenzara a interesar por cómo los factores ambientales en los cuales se desarrolla el crecimiento en los mamíferos, pueden, de alguna forma, programar la salud adulta. Tema del cual comenzaron a celebrarse congresos internacionales.

Todo ello porque mis intereses como investigador perinatalista habían sido siempre el estudio de alteraciones adquiridas, no genéticas, del desarrollo. La memoria presentada al Premio Nacional de Investigación Reina Sofía en el año 1994 se tituló “*Investigaciones encaminadas a la prevención de alteraciones adquiridas, no genéticas, del desarrollo*” memoria publicada, Documentos 41/94 por el Real Patronato de Prevención y Atención a Personas con Minusvalía después de concedido el Premio Nacional de Investigación Reina Sofía para España, del año 1994, ya citado. Nosotros, en mi grupo y otros muchos investigadores, habíamos estado estudiando alteraciones adquiridas por desequilibrios hormonales provocados en rata gestante o por malnutrición, y habíamos establecido la importancia de ambas líneas como agentes desencadenantes de un mal crecimiento fetal. Pero, en aquella época, no se conocía el mecanismo por el cual estos factores, modifican el genoma heredado, y producen un *epigenoma*, que es el que rige y finalmente detiene el crecimiento. De aquí mi interés por el estudio de los mecanismos epigenéticos y la epigénesis en general.

Así pues, a partir del año 2008, después de la publicación de la monografía citada, que constituyó un curso impartido en el Instituto de España, he venido tratando temas epigenéticos importantes para el desarrollo. En primer lugar, exponiendo la importancia de los nutrientes como factores moduladores del crecimiento y, posteriormente, estudiando

la adaptación a una situación de emergencia en periodos inmaduros, en la cual la situación de peligro juega un papel muy importante en el establecimiento del axis endocrino hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal que se programa, en humano, en periodos fetales

El 17 de enero de 2008¹¹ fui encargada del discurso inaugural de dicho curso en la RANF. Se tituló: “Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario” y fue publicado por dicha Academia. Su contenido es un recorrido por los estudios epidemiológicos y científicos que muestran como los niños nacidos pequeños para su edad gestacional presentan un factor de riesgo importante para manifestar, en su vida adulta, las dolencias comprendidas dentro del síndrome metabólico: resistencia a la insulina, dislipemia, hipertensión o alteraciones cardiovasculares, patologías que, además, comenzaban a ser muy frecuentes en las sociedades actuales.

En este discurso se narra cómo las primeras sugerencias de la correlación entre bajo peso al nacimiento y dichas patologías fueron primero descritas para alteraciones cardiovasculares y después, rápidamente se extendieron a diabetes 2, osteoporosis y desequilibrios metabólicos y endocrinos. También se narra que los primeros indicios aparecieron en 1989 y con bastante rapidez se llegó al paradigma del origen fetal de patologías de adulto. El primer congreso mundial tuvo lugar en Mumbai en la India, ya que los investigadores indios habían sido los primeros en dicha denuncia. Tuvo lugar en febrero de 2001. El segundo congreso tuvo lugar en el Reino Unido, en Brighton, en 2003, con dobles asistentes que el primero y se creó una sociedad con fines formativos Sociedad Internacional para el Estudio del Origen durante el Desarrollo de la Salud y Enfermedad (en inglés *International Society for the Developmental Origin of Health and Disease*) (DOHaI). En este congreso se estableció la idoneidad de los modelos animales para dichos estudios. Y el tercer congreso tuvo lugar en Toronto en 2006.

También en 2008 coordiné junto con el D. José María Medina, Académico de Número de la RANF una nueva monografía¹² titulada: “Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas” mi capítulo se titulaba: “Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticosuprarrenales”- y la del Dr. Medina “Alteraciones moleculares del desarrollo cerebral” y otros muchos capítulos interesantes de los Dres.: Gabriela Morreale, M^a Jesús Obregón. Carmen Álvarez, Emilio Herrera, Luis Goya de mi grupo, Fernando Escrivá, M^a Pilar Ramos Álvarez, Guillermo Sáez, Juan Tamargo, Máximo Vento, José Viña Ribes y Antonio Zorzano.

Tanto el descubrimiento de los procesos epigenéticos modulando el genoma heredado que, evidentemente, se produce en desarrollo ayudado por la plasticidad de los tejidos, como el reconocimiento, por estudios epidemiológicos, de la importancia de un retraso de crecimiento fetal, como marcador de posibles patologías adultas, señalan la gran importancia para la salud adulta de los estudios en dicho periodo, sobre todo de lo que nosotros habíamos llamado siempre, en nuestras

investigaciones, “alteraciones adquiridas del desarrollo”.

Pensando que otra de las “alteraciones adquiridas” importantes, producidas en periodo fetal, podría suceder a causa de tenerse que adaptar el organismo materno a una situación de peligro en el momento en que se programa, en el feto, de forma irreversible, su axis hipotálamo –hipofisis –corteza suprarrenal (axis HPA en el mundo anglosajón) comencé a interesarme y exponer en la Academia los estudios e investigaciones más recientes al respecto. Y estos estudios mostraban que la mala programación del axis HPA fetal se produce, en situaciones de peligro, por una disminución en el hipocampo fetal de los receptores de hormonas corticosuprarrenales, utilizando mecanismos epigenéticos que se comenzaban a conocer. Y, todo ello, como consecuencia de la llegada masiva al feto de hormonas corticoesteroides maternas a través de la placenta, secretadas debido al estrés materno. Dando lugar como resultado a la programación fetal anómala de un axis HPA mal regulado, y de forma irreversible en adulto.

Consecuentemente, en los últimos años, he dirigido mi trabajo académico a estudiar lo que se conoce y se investiga actualmente sobre cómo se adaptan los organismos a una situación de peligro que actualmente se denomina *allostasis*, etimológicamente, “estabilidad a través del cambio”^{13,14}. Las respuestas allostáticas se habilitan para defender a los organismos con fines de supervivencia e incluyen en las sociedades actuales las emergencias emocionales por inseguridades sociales.

La allostasis está regida a nivel cerebral, y en las redes allostáticas que se movilizan en la adaptación a situaciones de emergencia, la más importante sigue siendo la salida a plasma de glucocorticoides, tal y como ya enunció Selye en 1930, llamándole entonces “síndrome general de adaptación”¹⁵. Pero, actualmente, enriquecido con conceptos nuevos y nuevas investigaciones. Compendio de estos estudios se publicó en 2010 una monografía titulada¹⁶. “Acción de las hormonas a nivel cerebral” coordinada por mí y por el Dr. Medina titulado el capítulo del Dr. José María Medina “Epigenética del desarrollo cerebral. La nueva frontera de la neuroendocrinología” y mi capítulo “Acciones cerebrales de los esteroides: estado actual de la respuesta al estrés implicaciones en la conducta” cito ambos títulos porque son representativos del sentido divulgativo del libro. En él, intervienen: Dras. M^a Ángeles Arévalo y Carmen Ariznavarreta, Dres. Iñigo Azcoitia, Dr. E. Blázquez Fernández, Juan Bernal, Fernando Escrivá, Jesús Tresguerres, Luis Miguel García Segura, Ignacio Torres, Guillermo Sáez, José María Tormos, Álvaro Pascual-Leone García por citar los más significativos.

También en las Academias se rinde culto a la labor investigadora mundial y en la RANF se divulga el contenido cada año de los trabajos de los Premios Nobel de Fisiología o Medicina y Química, labor que en nuestra Academia dirige con éxito y dedicación el Dr. Lacadena Calero, Catedrático de Genética y hasta hace poco Vicepresidente de la Academia. También se conmemoran centenarios de acontecimientos científicos como el centenario del Premio Nobel de Química de Madame Curie en 1911¹⁷. Y también

My work at the RANF. What is the cultural job of academies?

se imparten cursos de temas monográficos en colaboración con universidades como el que se realiza todos los años sobre obesidad en la RANF en colaboración con la UCM de Madrid.

Resumiendo, los dos grandes temas tratados por mí han sido, primero, divulgar cómo se mantiene el equilibrio energético a través del cerebro exponiendo los últimos descubrimientos en el tema y, posteriormente, cómo han ido avanzando y ampliándose los conceptos para explicar cómo hacemos frente a situaciones de emergencia y conseguimos sobrevivir. Y todo ello referido a la importancia que ambas vertientes tienen para el desarrollo normal en periodo perinatal ya que, en dicho periodo, se programa de forma irreversible la salud adulta. Además, he tratado de divulgar, con conocimientos actuales, el dimorfismo sexual, que tiene lugar también en periodo gestante en el hombre, del mismo modo que la programación del eje hipotálamo – hipófisis-cortezasuprarrenal, y ambos de forma irreversible en humano. Temas, sin duda, elegidos por las vertientes cultivadas en mi vida activa como investigador. Y todo esto ha constituido el contenido de las aproximadamente veinticinco conferencias impartidas y ponencias de tres Mesas Redondas además de unas cinco tertulias y cinco Monografías coordinadas en que he intervenido

Actualmente, está en prensa para el próximo número de los Anales una Mesa Redonda titulada “*Posible papel del microbioma en el eje cerebro/intestino*” que coordiné el 15 de junio de 2017 y en la que intervinieron los Dres. Rafael Santandreu y Sebastián Cerdán Académicos de Número de la RANF. En ella tratamos de exponer y actualizar la posible acción de los virus, bacterias y protozoos que constituyen el microbioma del intestino, y que recientemente se están estudiando. El microbioma intestinal podría cooperar e interactuar quizá con el sistema peptinérgico cerebro/intestinal que, hoy sabemos, regula el balance energético. Y volvemos a enfocar las investigaciones nuevas hacia las vertientes científicas conocidas e investigadas.

Todos estos temas, forzosamente, están teñidos, por mis intereses científicos y la preparación lograda en mi vida profesional como investigador. Y eso sucede en las Academias con la labor de todos los académicos que, naturalmente, vienen de vidas intelectuales nutridas en vertientes científicas diversas. Yo he aprendido mucho de mis compañeros y espero haberles aportado algo con mi esfuerzo. Pero todas esas vertientes de labor realizada por los académicos, constituyen el patrimonio cultural de cada Academia

La divulgación constituye un conglomerado de conocimientos científicos o culturales lo más actualizado posible que no se puede hacer bien más que con un bagaje de conocimientos sólido, lo más grande posible, y adquirido durante años de trabajo. Teniendo, además, el poso científico que deja la experiencia de dicho conocimiento. Por ello es una tarea de personas no jóvenes. Pero dicha divulgación debe ir dirigida a jóvenes de excelencia en su periodo creativo ya que al menos, va a hacerles pensar y motivar. El respeto, la protección y difusión de la cultura termina, además, por elevar, con seguridad, el nivel educativo de las

sociedades. Y ello no se conseguirá más que tendiendo puentes a investigadores de excelencia más jóvenes

Teniendo la convicción de que los países necesitan cultivar los intercambios generacionales para verdaderamente alcanzar niveles culturales sólidos y prestigiosos, en 2012, coordiné una monografía tratando de dejar constancia, al menos en biomedicina, que es lo que conozco bien, de las biografías profesionales de investigadores de mi generación que hicieron el esfuerzo de crear las redes y el basamento, totalmente destruido después de una guerra civil, de la investigación biomédica en este país. La selección es pequeña, testimoniaron 20 personas y de ellas hay dos jóvenes en activo para tener la visión de personas actuales y sus problemas⁴. No soy quien para juzgar el resultado pero sí puedo decir que el libro fue elogiado y reiteradamente pedido y divulgado. Y consecuentemente con el interés intergeneracional, actualmente, las Academias de este país, sobre todo las de Ciencias, están implicadas en la creación de Academias Jóvenes.

La idea de *Youth Academies* o Academias Jóvenes¹⁸ es absolutamente europea, concretamente alemana, no voy a repetir lo que yo y muchos en las Academias hemos ya escrito. Una Academia Joven es para gente de 30-40 años y solo pertenecen a ella por 5 años. No tienen nada que ver las Academias jóvenes con las clásicas. En las jóvenes se busca seleccionar con comisiones internacionales, absolutamente limpias e independientes, los talentos creativos de cada país, y hacerlo cuanto antes. Y para esas generaciones de talento las Academias Jóvenes son una ventana internacional que les permite comunicarse con la gente de calidad intelectual del mundo. Mucha gente ha estado implicada en esta idea y hay ya cerca de 55 academias jóvenes o más creadas por todo el mundo, por supuesto en muchos países de Europa. Me gustaría poderles decir que está fundada la de nuestro país, pero, en este momento, solamente sigue en trámite con todo el expediente depositado en el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Las Academias desde su fundación tienen un papel consultivo en la sociedad que se ejerce puntualmente cuando se solicita. Actualmente, este papel consultivo se debería ampliar a problemas educativos y culturales y, en estos momentos, se plasma en artículos de opinión y editoriales en nuestra Academia^{19, 20}. El 9 de junio de 2016 coordiné presidida por el Excmo. Sr. Presidente de la RANF D. Mariano Esteban y con la Asistencia de la Secretaria de Estado del Ministerio de Investigación, Desarrollo e Innovación, Dña. Carmen Vela, titulada “*Educación – Investigación para el futuro: la Academia Joven de España*” y donde dimos voz a los seis españoles que ya pertenecen a la Academia Joven Mundial, creada en Berlín en 2010²¹

Hasta aquí he pretendido mostrar el hacer de las Academias recurriendo a hechos, por ello las citas exactas de mis publicaciones, perdónenme tanta cita.

Recientemente, se ha publicado en El País-26 de junio 2017- un artículo titulado *La democracia requiere hechos*” donde se destaca el papel y la importancia del periodismo (Antonio Caño, discurso de la apertura de los Cursos de

Verano, de la Universidad del País Vasco) Yo creo que “la verdad requiere hechos” y eso intento contarles mis “hechos” en la RANF. No he encontrado otra manera para mostrar con evidencias y publicaciones la verdad del hacer académico.

Otra cuestión: *¿Son los enseñantes de este país elegidos y tratados como merecen? ¿se aprovecha bien la divulgación académica?*

Actualmente, estamos hablando de la elaboración de una nueva Ley Educativa, consensuada política y territorialmente, pero nadie habla de la elección de los enseñantes. De todos los enseñantes en primaria, secundaria y universidad. Porque la Enseñanza con mayúscula, en un país, constituye un todo íntimamente relacionado. Y como he expresado en otros artículos la Educación, además, constituye un binomio indisoluble con la Investigación. Dificilmente tendremos buenos estudiantes de secundaria sin una buena escuela primaria Y creo que de la misma forma que se optó por seleccionar al final de Bachiller a los sanitarios, a los futuros médicos, se debería en este país seleccionar a todos los enseñantes. Porque habría que conseguir que los dedicados a la enseñanza fueran, no solamente los bien dotados intelectualmente, sino los más motivados por la Cultura de una forma amplia. Y ello se refleja, en los alumnos, sobre todo y desde la escuela primaria, en sus calificaciones escolares. Además, se debería cuidar al máximo el salario de los enseñantes, porque ello justificaría no solamente su selección, sino sería un acicate para que los más dotados quisieran dedicarse a la enseñanza. Pero, a mayor abundamiento, en la sociedades actuales, profundamente materializadas, y también en nuestro país, ayudaría mucho a que la sociedad civil les respetara., Solamente así, se conseguiría el respeto a los enseñantes. Y ello sería un modo bastante eficaz para aumentar y consolidar en nuestra sociedad civil el respeto a la Cultura y a la Educación y sus valores. Sé ha conseguido para los sanitarios y ha dado un resultado excelente en la sanidad nacional de este país. Vertiente admirada, actualmente, por países más cultos que el nuestro, pero que tienen sanitariamente un más bajo nivel, de aquí que acudan al nuestro en sus problemas patológicos. Si se consiguiera todo ello, España no solamente sería un país turístico por sus playas sino verdaderamente prestigioso y respetado en vertiente cultural. Y lo podemos hacer, no hay más que tomar conciencia y ponerse a ello Otro ejemplo de toma de conciencia colectiva, con éxito rotundo, ha sido nuestro sistema de trasplantes, verdaderamente, admirado en todo el mundo.

No se puede, en los programas televisivos, hablar solamente de “los emprendedores” para ayudar a ganar dinero a la gente que está muy bien, pero que no podemos en el siglo XXI ser solamente eso, y dejar de ser un país con un nivel de Cultura que corresponda a nuestra historia y que merecemos. No podemos solamente intentar tener pequeños “Trump” a nuestro alrededor. España y su Cultura, de país occidental y antiguo, descubridor de América, se merece y puede hacer mucho más. Eso es lo que se siente cuando se ha dedicado la vida a investigar en España. Se llega a la certeza de la capacidad imaginativa de nuestro pueblo, y de lo que

podemos hacer si tomamos conciencia de ello.

Conciencia colectiva y dejarnos de reclamar y reivindicar nacionalismos totalmente trasnochados en el mundo global en el que ya estamos. Este país con sus diferentes peculiaridades culturales necesita tomar conciencia de la riqueza que esas diferencias pueden dar si nos dedicamos a que se sumen. Sin absurdas pretensiones de supremacía en ninguna de las culturas que componen España. Llevo muchos años en Madrid, pero nací en Valencia y estude en Barcelona, además viví y trabajé en Andalucía, conozco, muy bien la creatividad mediterránea, pero también, la generosidad andaluza, la austeridad castellana, y, en general, la capacidad inagotable y fortaleza de todos los pueblos de este país unidos.

Para el reciclaje y la actualización de la cultura y la base científica de las personas dedicadas a la enseñanza se debería recurrir a las instituciones culturales de nuestro país, especialmente a las Academias. Los cursos monográficos que se imparten, así como las conferencias de alto nivel y Mesas Redondas que se dan tienen un contenido que serviría muy bien para ello. Su contenido es suprauniversitario, precisamente, de ampliación y de reciclaje actual de los diversos temas culturales. Pero para ello hay que tomar conciencia y reforzar esa faceta en las Academias, mimando económicamente el Estado su dotación y no restringiéndolo rápidamente en tiempos de crisis, sino ampliándolo cuanto fuera posible. Se debería, además, difundir la labor académica como un bien estatal, solicitando su apoyo y opinión sobre temas educativos. En las Academias se concentran gentes que han dedicado toda su vida a la docencia en sus grados más altos y, también, los que la han dedicado a la investigación básica lo que supone haber ejercido una docencia sobre cómo hacer ciencia, que conduce, forzosamente, a la motivación personal por la cultura en cualquier vertiente, lo cual es absolutamente necesario para la enseñanza universitaria.

En las Academias se concentra gente con experiencia y la experiencia no se improvisa, es una realidad que no se puede transmitir, hay que adquirirla con los años. La tienen personas mayores siempre y se debería, no solamente respetarla, sino sostenerla y ampararla, aprovecharla, consultando opiniones al máximo en los temas educativos y de cultura. Ya que en ellas no cabe duda que reside esa cuestión tan difícil de definir como la experiencia. Y, conjuntamente, apoyar al máximo cualquier acercamiento que se pueda hacer entre los miembros de las Academias clásicas y la juventud brillante de los países. Todo ello ha hecho que las Academias de Ciencias de nuestro país estén, bastante en solitario por cierto, apoyando la idea de creación de las Academias Jóvenes.

¹ 1977. Prof. A. Jost. Profesor en el Colegio de Francia, Lab. de Physiologie du Developpement. Place Marcelin-Berthelot, Paris 5° (Francia),1978. Prof. J. Legrand. Lab. de Physiologie Comparée, Université des Sciences et Technique du Languedoc, 34060 Montpellier (Francia).1979. Prof. C. Petter. Lab. de Physiologie du Developpement, Bâtiment C, 5° etage 4-place Jussieu 75230, Paris (Francia). 1980. Prof. E. Vigoroux. Lab. Physiologie Comparée, Faculté des Sciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris 5°

(Francia).1982. Prof. J. Girard. en aquel momento Director del Centre de Recherches sur la Nutrition du C.N.R.S., Meudon-Bellevue (Francia).1983. Prof. M. Rieurtort, Maître Assistant, Collège de France. Lab. de Physiologie du Développement, Place Marcelin-Berthelot, Paris 5° (Francia). 1984. Prof. Pic, del laboratorio de Endocrinologie Cellulaire. Institut de Chimie Biologique, Université de Provence, Centre St. Charles. Marsella (Francia). Algunos de estos profesores dieron también conferencias y comunicaciones cortas en el Instituto de Bioquímica.

² Premios significativos: Medalla de Plata de la "Academie Internationales de Lútece". 8° Grand Concours International, 1976. París. Los premios de la RANF Alter en 1978, Abelló en 1979 y el premio Fundación Folch a la Tesis de Cecilia Alaez Usón titulada: "Actividad 5'-desyodasa y regulación del axis tiroideo en rata neonatal subnutrida" Finalmente **recibimos en 1994 el Premio Nacional de Investigación Reina Sofía, para España**, que concede, cada dos años, el Patronato de Prevención de las Deficiencias. Muy satisfactorio para nosotros puesto que la aplicación clínica de nuestras investigaciones básicas era la prevención de la subnormalidad.

³ A. M. Pascual-Leone: "Nutrición y desarrollo: regulación de los factores de crecimiento IGFs An.Real. Acad. Farm.64:347-65, (1998), "Interacción entre hormonas tiroideas y factores de crecimiento IGFs" Anal.Real.Acad.Farm.66:185-202, (2000) y Regulación del crecimiento: axis GH/IGFs e hipótesis neuroendocrina Anal.Real.Acad.Farm.67:402-23, (2001).

⁴ A.M. Pascual-Leone "La larga marcha hacia una línea de investigación sobre desarrollo perinatal" en Retroceso en el tiempo: la investigación biomédica en España. Testimonios y reflexiones lecturas para el futuro" Madrid. Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) 2012, 390 p. ISBN:978-84-938172-8-2, lo encontraran en el link de la pag web de la RANF: <http://www.analesranf.com/index.php/especial/articulo/view/1401/1437>.

⁵ L. Goya, A. de la Puente, S. Ramos, M. A. Martín, F. Escrivá, A.M. Pascual-Leone. "Regulation of IGF-I and -II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes". Journal of Biological Chemistry 274:24633-24640, 1999.

- A. de la Puente, L. Goya, S. Ramos M.A. Martín, C. Alvarez, F. Escrivá, A.M. Pascual-Leone."Effects of experimental diabetes on renal IGF/IGFBP system during neonatal period in the rat". American Journal of Physiol. Renal Physiol. 279:F1067-F1176, 2000.

-S.Ramos, L.Goya, C.Alvarez MA. Martín A.M.Pascual –Leone.: "Effect of thyroxine administration on the IGFs/IGF binding protein system from neonatal period in the rat" J. of Endocrinology 169:111-122, 2001

- M. Agote, L. Goya, S. Ramos, C Alvarez, ML Gavete, A.M. Pascual-Leone and F. Escrivá. "Glucose uptake and glucose transporter protein in skeletal muscle from undernourished rat". American Journal of Endocrinology 281:, 2001.

- S. Ramos, L Goya, C Alvarez, M.A. Martín, M Agote, F Escrivá and A.M. Pascual-Leone. TITULO: "Different role of insulin on GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism". American Journal of Physiology Endocrinol Metab 281: E1078-E1081, 2001.

- L. Goya, J.A. Chowen, S Ramos, S Busigina, MA Martín, AM Pascual-Leone and LM García-Segura. "Effect of early undernutrition on the brain insulin-like growth factor -I system". J. of Neuroendocrinol.14:163-69.2002

- Martín A. M.,P. Serradas,S.Ramos,, A.M.Pascual-Leone.B.Portha,and C. Alvarez "Protein -Caloric Food Restriction

Affects Insulin -like growth factor system in fetal Wistar rat " Endocrinology. 146:1364-71, 2005.

⁶ A.M. Pascual-Leone:

Influencia de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo" impartida el 14 de abril del 2005 en las Tertulias Científicas de la Real Academia Nacional de Farmacia junto con el Dr. Lacadena.

"Bases científicas de la diferenciación sexual. Reflexiones" impartida el 4 de junio de 2009 en Real Acad. Nac. Farm. En la Tertulia Científica.

"Diferenciación sexual:el factor de Jost" conferencia impartida el 16 de abril de 2009 en la Real Acad Nac. Farm. y publicada en los Anales de la Academia Vol LXXV nº3, pag.419-66,2009

"Dimorfismo sexual cerebral en el siglo XXI: su incidencia terapéutica " conferencia impartida el 29 de septiembre de 2011 en Tertulia Científica realizada en el Real Acad. Nac. Farm dentro del tema "El cerebro y las enfermedades del cerebro " celebrado en dicha Academia con motivo de ser el año dedicado mundialmente al cerebro.

"Diferenciación y dimorfismo sexual durante el desarrollo " impartida el 5 de mayo de 2011 en el curso de Doctorado de la Real Academia Nacional de Medicina los días 4 y 5 de mayo curso dirigido por el Dr. D. Enrique Blázquez Fernández, académico de Número de Medicina. VIII Curso para Postgraduados titulado "Fundamentos Moleculares de la Medicina" y encuadrada en la sección "Dimorfismo, identidad y diferenciación sexual".

⁷A.M.Pascual-Leone "Balance energético: su implicación en el desarrollo humano" Reial Academia de Catalunya XIII, 3ª epoca (27) 89-109, 2004. página/ A.M.Pascual-Leone "Desarrollo y Balance energético: factores endocrinos comunes e interdependencias" Reial Academia de Farmacia de Caralunya XIII, 3ª epoca, (29): 49-89, 2006.

⁸A.M.Pascual –Leone "Control neuroendocrino del balance energético: el adiposito secretor" en: "Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías" Editora A.M. Pascual-Leone Monografía XVIII, Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, 2005.

⁹ A.M.Pascual –Leone. "Balance energético: leptina". An. Ral. Acad. Nac. Farm. 69: 257-287. (2003).

A.M.Pascual –Leone. "Eje cerebro intestinal: orexinas. An. Real Acad. Nac. Farm. 70: 905-931. (2004).

¹⁰ A. M. Pascual-Leone, Coord. "Desarrollo Fetal y Neonatal" en "Procesos epigenéticos: postformación y factores externos"curso impartido23-26 octubre en el Instituto de España. 2006.

¹¹ A. M. Pascual-Leone. "Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario" Discurso Inaugural del Curso 2007-2008 Real Academia Nacional de Farmacia, 17 enero de 2008 publicación de la RANF.

¹² A. M. Pascual-Leone "Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticosuprarrenales" en; "Desarrollo Perinatal: Origen de Patologías Adultas" Editores A. M. Pascual-Leone y José Mª Medina Monografía Real Academia de Farmacia XXIII Instituto de España y Fundación Areces, Curso coordinado en Instituto de España 2008.

¹³ "El concepto de allostasis en la biomedicina actual", conferencia impartida en la Mesa Redonda titulada " Fisiología y control cerebral del comportamiento " coordinada por la Dra. A. M. Pascual-Leone y el Dr. José M. Medina, Académicos de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia el 29 de noviembre de 2012.

¹⁴ Revisión An. R. Acad. Nac. Farm- vol 79-81 pag.69. 2013 "El concepto darwiniano de la allostasis. Epigénesis".

¹⁵ SELYE H. "A syndrome produced by diverse nocuous agent" Nature 138:132 (1936)

¹⁶ A.M. Pascual-Leone Acciones cerebrales de los esteroides: estado actual de la respuesta al estrés" en; "Acción de las hormonas a nivel cerebral " Editores AM-Pascual-Leone y José M^a Medina Monografía XXIX Curso Instituto de España y Real Academia Nacional de Farmacia,y Fundación Areces (2010).

¹⁷ A. M. Pascual-Leone. "Maria Sklodowska-Curie (1867-1934). Categoría científica y solidaridad humana". An. R. Acad. Nac. Farm. Vol. 77, n^o4 pag. 8-12, 2011.

¹⁸ Pascual-Leone, AM. Academia Nacional Joven: ¿vamos a dejar pasar el tren para España? An Real Acad Farm 2014; 80, 1: 4-8.

[<http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1483/1525>]. Dicho editorial fue también publicado en la publicación trimestral de la SEBBM de junio de 2014 n^o 180 adaptado a dicha revista "Academia Joven Nacional:¿vamos a dejar pasar el tren para España?"

¹⁹ Pascual-Leone, A. M." Pay Attention: do we really need an economical model based on knowledge?[Título en español: Llamada de atención: ¿queremos verdaderamente un modelo económico basado en el aporte de conocimiento?]. An Real AcadFarm 2015; 81, 3: 224-9.

<http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1660/1686>. Pascual-Leone AM. "Investigación-Educación y viceversa: la gran asignatura pendiente" Panacea n^o 4 junio, 2015, pag. 30-41, Monográfico: La bioquímica española, Severo Ochoa y centro de Biología Molecular (CBM). www.revistapanacea.com.

²⁰ Pascual-Leone, A. M. "Fundamental absences of political discourse" [Título en español: Ausencias fundamentales en el discurso político actual]. An. Real Acad. Farm. 2016; 82, 3. <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1772/1762>.

²¹ 9 junio 2016-: Sesión sobre política científica actual, centrada en la creación de una Academia Joven Nacional. Titulada:" Educación-Investigación para el futuro: la Academia Joven de España" Presidida por el Excmo. Sr. Presidente de la RANF. D. Mariano Esteban y con la asistencia de la Excma Sra. Secretaria de Estado del Ministerio de Investigación, Desarrollo e Innovación. Coordinada y presentada por A. M.Pascual-Leone. PONENTES: Excmo Sr. D. David Rios, Acad de Número de la RACEFyN; Profesores jóvenes: Dr. D. Javier Martínez Moguerza, Prof. Titular de Estadística e Investigación Operativa Universidad Rey Juan Carlos; Prof. Dr. D. Juan Antonio Gabaldón Estevan, Investigador ICREA. (An Real Acad Farm 2016; 82, 3: 338-351). <http://www.ranf.tv/index.php/video/414/mesaredonda-educaci%C3%B3n-investigaci%C3%B3n-para-el-futuro-la-academia-joven-de-esp%C3%B1a>.



Dichromate oxidation of ethanol and phenol bromination: a tale of two reactions

Title in Spanish: *Oxidación de etanol por dicromato y bromación de fenol: historia de dos reacciones*

Purificación Sáez Plaza¹, Julia Martín¹, Agustín G. Asuero^{1*}

¹Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla.

ABSTRACT: A brief account of the worth and history of two relevant reactions, the dichromatometric oxidation of ethanol and phenol bromination is attempted in this paper. Titrimetric analyses of ethanol and phenol are outlined.

RESUMEN: Un breve informe de la importancia e historia de dos reacciones relevantes, la oxidación de etanol con dicromato y la bromación de fenol se describe en este trabajo, en el que se perfilan las valoraciones volumétricas de etanol y fenol.

*Corresponding Author: asuero@us.es

Received: July 25, 2017 Accepted: October 18, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 3 (2017), pp. 313-320

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

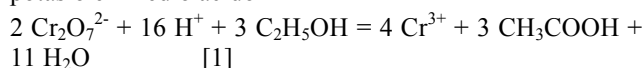
La importancia de la determinación volumétrica de etanol y fenol es indudable. Se han sugerido una variedad de procedimientos analíticos (1-6) para la determinación de etanol. La disolución de etanol referencia internacional (7-8) se prepara por el método de oxidación con dicromato. El método del dicromato (10-11) ha sido objeto de varios estudios colaborativos. Por otra parte, el método de Koppeschaar, en el que se usa una mezcla de bromato y bromuro en disolución ácida como sustituto de bromo libre (11-12), fue el primer método propuesto para la determinación de fenol.

2. DETERMINACIÓN DE ETANOL

La determinación de etanol (C₂H₅OH) es muy importante (13) en los procesos de control de fermentaciones y para especificaciones legales referentes a bebidas alcohólicas. Con la excepción de la cafeína, el alcohol etílico es la droga más ampliamente utilizada en nuestra sociedad, y la determinación de alcohol en fluidos corporales es quizás el método más comúnmente llevado a cabo (14) en análisis de drogas. El etanol ha ganado recientemente atención (15-16) como un producto energético atractivo. La oxidación de alcoholes por cromo(VI) se ha utilizado para enseñar algunos principios básicos de cinética (17-18). Esta reacción constituye también el principio básico del cambio de color en el ensayo químico de alcohol en el aliento (19-20), desarrollado por Borkentein en 1954, y que todavía se usa con propósitos de "screening" (21-22). Si el ensayo da negativo no se requiere búsqueda posterior de sustancias volátiles; si da positivo se requiere una confirmación del ensayo para asegurar la presencia del alcohol etílico.

Los métodos de determinación de etanol que utilizan

(Eqn. 1) un exceso de disolución patrón de dicromato de potasio en medio ácido



y posterior valoración por retroceso ofrecen (9) una buena reproducibilidad. La valoración directa no es posible incluso a elevadas temperaturas. Se prefiere una disolución de dicromato de potasio como agente oxidante ya que la disolución es estable indefinidamente, lo que evita la necesidad de una periódica nueva estandarización. Las disoluciones de dicromato poseen un color amarillo anaranjado, mientras que las disoluciones de Cr(III) suelen ser bien verdes o violetas, dependiendo de la composición del medio en el que se forma el producto de reacción. Se eligen las condiciones (23) de tal manera que se obtiene un máximo rendimiento de ácido acético y un mínimo de dióxido de carbono y acetaldehído. Para prevenir pérdidas de acetaldehído (producto intermedio en la oxidación) durante la digestión, el alcohol se oxida en un frasco cerrado. La reacción puede monitorizarse también espectrofotométricamente, vía absorbancia a 600 nm, frente a un blanco (24-25).

El exceso de dicromato se valora por adición de un exceso de yoduro y posterior valoración del yodo así formado (Opción 1) con disolución patrón de tiosulfato de sodio, añadiendo al final como indicador almidón recién preparado, después de que la mayor parte del yodo es consumida, i.e., cuando el color adquiere un tinte verdoso. Note que el almidón tiende a hidrolizarse en medio ácido y que se produce una lenta disolución del complejo yodo-almidón formado, si se absorben grandes cantidades de yodo. La disolución de tiosulfato se añade hasta que el color azul oscuro se torna en un verdoso azulado claro, lo que requiere cierta práctica para la detección del punto

final de la valoración.

Como segunda opción, se valora el exceso de dicromato con una disolución patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (sal de Mohr). La disolución de sulfato ferroso amónico, i.e., sal de Mohr, que también debe contener ácido sulfúrico, se oxida lentamente en contacto con el aire, lo que implica que el reactivo debe estandarizarse antes de su uso, cuando sea necesario.

Una tercera opción implica la adición de un exceso de sal de Mohr al exceso de dicromato y posterior valoración del hierro(II) remanente con una disolución patrón de KMnO_4 . Esta última opción, que implica el uso de tres disoluciones patrón cuidadosamente preparadas, fue la primera utilizada (26).

Maurice Nicloux (1873-1945) (Figuras 1 y 2) doctor en medicina y en ciencias (27), Jefe del Laboratorio de la Clínica Tarnier en rue d'Assas, antiguo nombre de la "Clinique d'accouchement" (o Maternidad) de la Facultad de Medicina. Desarrolla un interesante trabajo sobre el

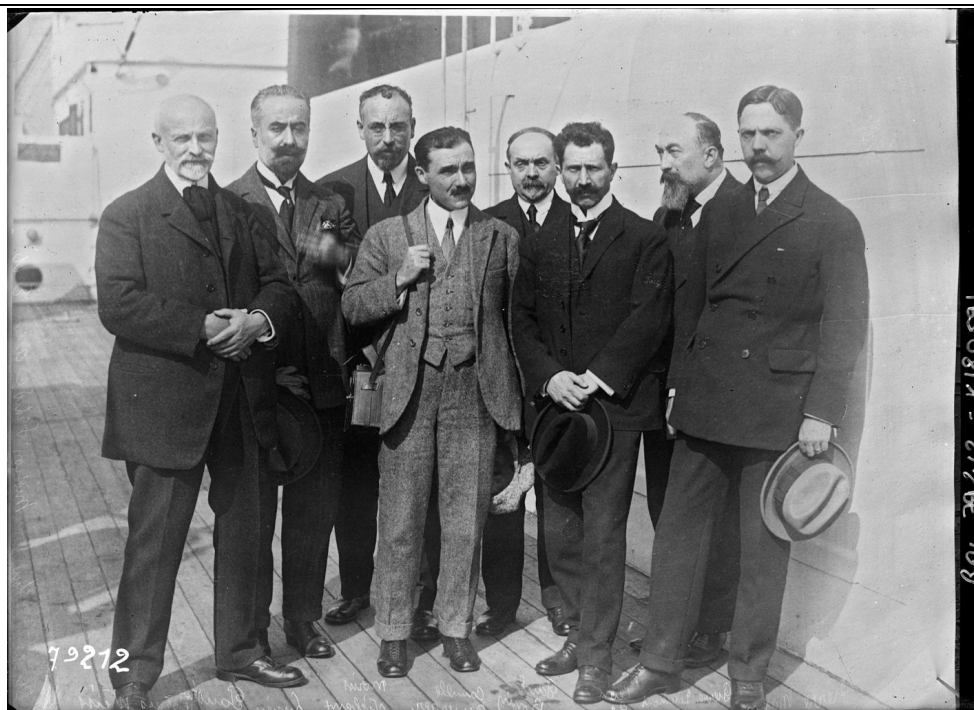
paso de alcohol y otros venenos de la madre al feto, así como estudios sobre el valor nutritivo de la leche. Médico, físico y bioquímico, especialista en determinaciones gaseosas y alcohólicas sanguíneas (28). Fundador de la "Société de chimie biologique", hoy día "Sociedad francesa de bioquímica y biología molecular" (SFBBM). La SFBBM hace entrega cada año del premio Maurice Nicloux a un joven investigador o docente de su disciplina. Oficial de la Legión de Honor.

El sueco Widmard (29), fundador de la "etanología" forense (30), presentó en 1922 una modificación del procedimiento de oxidación de Nicloux (valoración por retroceso del yodo formado al añadir un exceso de ioduro del dicromato en exceso) en la que se han basado todas las posteriores procedimientos químicos (31-33). Esa mejora, de tanta importancia, contribuyó a la puesta en marcha (34) en 1920 del "Act on Alcohol Prohibition" impuesta en USA.



Source: GATELADULTY / BIBLIOTHÈQUE NATIONALE ET UNIVERSITAIRE DE STRASBOURG

Figura 1. Caricatura de algunos profesores (o encargados de curso) de la Facultad de medicina de Strasbourg, Carb, Librería de la Mésange (Strasbourg), 1931. Coll. de la BNUS. De izquierda a derecha, y de arriba abajo: Léo Ambard, Charles Kayser, Auguste Gunstett, Raymond Keller, Jean Alexandre Barré, Alfred Weiss, Prosper Merklen, Jean Røederer, André Forster, René Leriche, Fred Vlès, Paul Blum, Paul Rohmer, Alfred Hanns, Philippe Bellocq, Maurice Nicloux.



Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France

Figura 2. [De derecha a izquierda.] Pierre Masson, Pierre Dumont, Léon Blum, Paul [i.e. Pol] Bouin, Camille Duverger, Moriss [i.e. Maurice] Nicloux, Lucien[-Marie] Pautrier et Georges Weiss, Misión de estudios en los Estados Unidos (concerniente a la fabricación semiindustrial de insulina de origen extractivo; cliché Keystone: [fotografía de prensa] / [Agence Rol].

La opción 2 pudo ser aplicada una vez que se dispuso de indicadores redox reversibles para la detección del punto final. Cordebard (35) usa en 1939 un exceso de dicromato en ácido nítrico concentrado para oxidar el alcohol contenido en los destilados, aplicando a continuación una valoración iodométrica indirecta. El método de Cordebard de determinación de etanol en sangre llegó a ser método de análisis oficial (36-37) en Francia en 1955, el primero de los métodos oficiales.

Henri Cordebard (1891-1977) (Figuras 3 y 4), un gran farmacéutico y universitario (37-39), es un personaje discreto y poco conocido. Nace en 1891 en Gondrecourt en la Meuve. Decide seguir la carrera de Farmacia en memoria (40) de su tío abuelo Nicolas-Jean-Baptiste-Gaston Guibourt (1790-1867), titular de la cátedra de historia natural de los medicamentos (41), en la Escuela Superior de Farmacia de París desde 1832, reemplazando a Joseph Pelletier, hijo de Bertrand Pelletier, quien alcanza fama mundial junto con su colega farmacéutico Joseph Biebaimé Caventou (1795-1877) en el campo de los alcaloides, gracias a la fructífera colaboración que mantuvieron. Guibourt es conocido sobre todo por su enseñanza de la materia médica que más tarde vino a llamarse farmacognosia.

Cordebard estudia farmacia en Nancy donde obtiene su Diploma en 1919, tras finalizar la guerra, en la que sirve como enfermero, ayudante químico y posteriormente farmacéutico auxiliar, ejerciendo funciones de médico auxiliar. Por este motivo recibe la cruz de guerra y la medalla de Verdún. Ya en 1913 había sido preparador

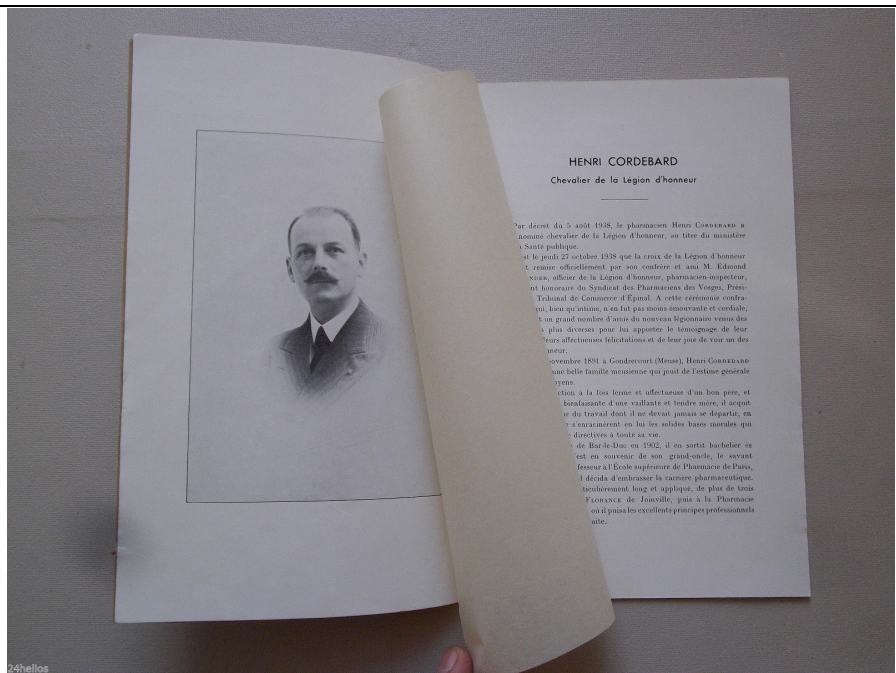
delegado (42) del curso de “Pharmacie chimique” en la Escuela de Farmacia de Nancy. Preparador de la Escuela de Farmacia de Nancy en 1919, a la que acude en noviembre de 1918 llamado por el profesor Louis Bruntz (1877-1944), encargado del curso de materia médica (43), titular de la cátedra desde 1911 y Director de la Escuela, con objeto de organizar un laboratorio militar de preparaciones galénicas. Cordebard, es jefe de trabajos prácticos de química y análisis químico desde 1919 a 1941. Durante estos años consagra su actividad de investigación a la búsqueda y estudio de las aplicaciones de la oxidación crómica a la determinación de alcohol. A estos trabajos se añaden otros de química mineral, orgánica, biológica y de toxicología. Doctor en Farmacia en 1922 con un trabajo sobre el empleo de la mezcla crómica en análisis químico. Encargado de curso complementario de análisis químico de 1927 a 1941. Caballero de la Legión de Honor en 1938 a propuesta del Ministerio de Salud (39). Movilizado como capitán farmacéutico en 1939-1940.

Tesis en Farmacia superior en 1941 sobre la oxidación crómica en análisis cuantitativo (44). Su método cromométrico de determinación de alcohol en sangre reemplaza a métodos empíricos, marcando el camino de las técnicas exactas y reproducibles, permitiendo la puesta a punto de un método oficial (38) de determinación aparecido en 1955. Encargado de cátedra de química analítica y toxicología en 1942, maestro de conferencias en 1946, y profesor honorario por decreto de 27 de febrero de 1950. Es también durante mucho tiempo farmacéutico de

la Casa departamental de Secours, y de la maternidad regional, e inspector de farmacia del Departamento de los Vosgos. Muere en Nancy en 1977.

Las condiciones de oxidación para la técnica del dicromato potásico oscilan entre calentamiento a 85 °C y reposo durante varias horas a 20 °C. Los resultados no son afectados por comparativamente largas variaciones de temperatura o de acidez. La velocidad de oxidación del etanol (17-18, 45) a ácido acético es proporcional a la concentración de etanol y a la de iones dicromato, y proporcional al cuadrado de la concentración de iones

hidrógeno. La reducción cuantitativa de dicromato por etanol puede lograrse a temperatura ambiente en un tiempo razonable, i.e. 10 minutos (23), si las concentraciones mínimas de ácido y dicromato son 5 y 0,3 M, respectivamente. La acidez sin embargo no puede incrementarse más en orden a evitar un incremento excesivo de la viscosidad, que origina una impedancia hidrodinámica. La reacción es completa si el exceso de dicromato es (46) más de un veinteavo de la cantidad inicial.



Figuras 3 (parte superior) y 4 (parte inferior). Henri Cordebard (1891-1977) en el Acto de entrega de la Legión de Honor (H. Cordebard, Discours Order de la Légion d'Honneur, Imprimerie Belger-Lavrault: Nancy-Paris-Strasbourg, 1939).

Las principales incertidumbres provenientes en la química de la oxidación del etanol por dicromato conciernen a (9, 47-49): i) la pureza del dicromato patrón; ii) la extensión de la reacción de oxidación; iii) la incertidumbre proveniente de la determinación del punto final de la valoración. En medios complejos (fluidos biológicos, bebidas alcohólicas), es necesario efectuar una separación preliminar del etanol por destilación, (micro)difusión o extracción por disolventes (16, 23), lo que no plantea ningún problema debido a su volatilidad.

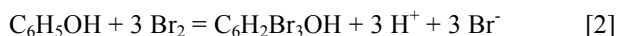
3. DETERMINACIÓN DE FENOL

El fenol, conocido también como ácido carbólico, es un importante producto químico industrial (50) usado en la fabricación de resinas, madera contrachapada, plásticos y productos farmacéuticos. El fenol encuentra uso en aplicaciones médicas (51) como un desinfectante suave (mild). Se empleó ya en 1865 como antiséptico quirúrgico (52-53) por Lister, un médico escocés, de cuyo nombre derivó más tarde el nombre comercial de "Listerine".

Formulaciones sencillas conteniendo fenol se han usado (54) en jabones germicidas, lociones y sprays aerosol. La actividad de la mayor parte de las sustancias germicidas se compara con (54-55) la de fenol como sustancia estándar. La máxima concentración de fenol y de sus sales alcalinas en jabones y champúes (56) se encuentra limitada por ley en el Reino Unido al 1%, calculada como fenol.

La mayor parte de las reacciones de bromación orgánicas analíticamente importantes implican la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno del fenol por átomos de bromo. En realidad son reacciones de sustitución electrofílica sobre el núcleo aromático (57), que son activadas por sustituyentes donadores de electrones. Podemos obtener de esta manera información tanto cualitativa como cuantitativa (58) en relación al compuesto. La bromación por fenol también suministra ejemplos importantes de cinética de disoluciones acuosa (59-62) y no acuosas (63).

El bromo se forma en reacciones estequiométricas entre bromato y bromuro en medio ácido (HCl), en frascos con tapón esmerilado para prevenir pérdidas de bromo debido a su volatilidad, $\text{BrO}_3^- + 5 \text{Br}^- + 6 \text{H}^+ = 3\text{Br}_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$. La cantidad de bromato potásico utilizado determina la cantidad de bromo generado; un exceso de Br^- incrementa la disolución del bromo como ión tribromuro, Br_3^- . El bromato potásico es un sólido granular que puede ser exactamente pesado. El bromo liberado reacciona con el fenol presente en la muestra originando 2,4,6-tribromofenol



Se abre así la vía bien para el análisis (11) por pesado del producto bromado o para la determinación volumétrica de la cantidad de bromo consumida en la reacción de bromación. El método volumétrico es más satisfactorio, requiriendo de una valoración por retroceso ya que la reacción [2] es lenta y necesita su tiempo para proceder. El exceso de bromo se valora con un exceso de KI, y el yodo

formado se valora finalmente en una disolución patrón de tiosulfato sódico, conforme al método de Koppeschaar (64-67).

El método se encuentra todavía en uso (68, 51) y ha sido aplicado a una variedad de compuestos orgánicos. Tres tipos de errores se presentan (69): i) oxidación de sustancias fácilmente oxidables, i.e., o- y p-aminofenol; ii) precipitación incompleta de productos bromados, i.e., especialmente compuestos para sustituidos iii) reemplazo de algunos grupos tales como $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, o $-\text{SO}_3\text{H}$, por bromo. Factores tales como el periodo de reacción y la cantidad de exceso de bromo deben regularse para evitar (12) resultados tanto bajos como elevados. El método de bromación es aplicable a la determinación de fenol y de cresol (70) en la mayor parte de los jabones comerciales. Kolthoff and Belcher (71) han revisado el desarrollo y la aplicación de este método clásico.

Willem Frederik Koppeschaar (1831-1909) (Figura 5) nace en Leiden y muere en La Haya. Estudia en la Universidad de Leyden (72), doctorándose el 8 de junio de 1867 con la tesis: "Sobre la determinación cuantitativa de ácido nítrico". En 1868 fue nombrado profesor de química, zoología y botánica en la escuela de los ciudadanos mayores en La Haya, y desde 1874 a 1895 sólo de química. También fue director durante algunos años. Sus investigaciones se movían sobre todo en el área de la química analítica. Además del tema de su disertación, se pueden mencionar la determinación de fenol, y la separación y determinación de alcaloides chinchona (que no llegó a publicarse), determinación de sulfato de quinina y la de carbonato de magnesio en piedra caliza. Autor de varios libros de texto sobre la química, i.e., "Leerboek der Chemie".



Figura 5. Willem Frederik Koppeschaar (1831-1909). <http://www.biografischportaal.nl/persoon/40181450>

Hans Heinrich Landolt (1831-1910), químico suizo (73-74) fue quien primero encontró que la reacción del fenol con bromo es satisfactoria tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo (11, 75-77), antes de que se aplicara con fines volumétricos. Landolt es descubridor de la reacción del reloj de yodo ($\text{HIO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_3$), autor de uno de los estudios cuantitativos más certeros sobre la ley de la conservación de la masa en las reacciones químicas (78), y fundador de la base de datos Börnstein. Fue profesor de química en la Academia de Agricultura y posteriormente profesor de la Universidad de Berlín. Los últimos trabajos de Landolt se situaron en el ámbito de la químico-física y su handbook de constantes en sus ediciones actualizadas están en uso hoy día (11).

4. COMENTARIOS SOBRE AMBAS REACCIONES

La determinación cuantitativa de etanol en muestras de sangre y orina se lleva a cabo (3, 79) en laboratorios clínicos y forenses, en conexión con ingestión de bebidas y legislación sobre ingestión, y condiciones patológicas (80) de los pacientes. El contenido de etanol es muy importante para la sensación bucal y el aroma (4) de las bebidas alcohólicas. Los métodos volumétricos, aunque populares hasta la década de 1970, han sido reemplazados casi enteramente por métodos enzimáticos y de cromatografía de gases (22). Los analizadores químicos de etanol en aliento ya no se encuentran en uso (81); están basados ahora en absorción infrarroja y posterior confirmación por GC y LC de ser necesario. La determinación de etanol en vino y licores es crítica en el control de calidad en la industria de la alimentación y puede también llevarse a cabo (82-83) por el método del dicromato. Los métodos de Corderbard (con destilación previa) y de GC son los dos métodos legales aprobados en Francia (84). El único método legal en análisis forense en casos de ingestión de alcohol por conductores en Bélgica, se basa (3) en la oxidación química. El método de Cordebard es también oficial (2) en Rumania.

Los métodos antiguos de análisis de fenol en mezclas derivadas de "alquitrán de hulla" no son específicos y determinan el contenido fenólico total. Estos métodos químicos por vía húmeda implican el aislamiento preliminar y destilación o extracción líquida seguido por volumetría o colorimetría. Las más recientes aplicaciones analíticas de fenoles están basadas en técnicas de separación cromatográficas. Sin embargo, los métodos de bromación se utilizan todavía para la determinación residual de fenol (85) en plásticos y resinas. Las valoraciones por desplazamiento con el uso de bromo se utilizan en ensayos farmacológicos (86-88) de fenoles y compuestos relacionados en diversas farmacopeas.

5. REFERENCIAS

1. Michalowski T, Asuero AG, Ponikvar-Svet M, Michalowska-Kazmarczyk AM, Wybraniec S. Some examples of redox back titration. *Chem. Educator* 2014; 19: 1-6.
2. Dorubet D, Mircea C, Astarastoe V, Butnaru E. Validation of a GC/MS method for ethanol quantitative analysis using as internal standard tert-butanol. *Farmacia* 2011; 59 (5): 721-728.
3. Devleeschouwer N, Libeer JC, Martens FK, Neels H, van Damme M, Verstraete A, Deveaux M, Wallemeq PE. Blood alcohol testing: comparison of the performance obtained with the different methods used in the Belgian external quality assessment schemes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42 (1): 57-61.
4. Wang M, Choong Y-M, Su N-W, Lee M-H. A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *J. Food Drug Anal.* 2003; 11 (2): 133-140.
5. Crowell EA, Ough CS. Research Note. A modified procedure for alcohol determination by dichromate oxidation. *Am. J. Enol. Vit.* 1979; 30 (1): 61-63.
6. Jain NC, Cravey RH. Analysis of alcohol I. A review of chemical and infrared methods. *J. Chromatogr. Sci.* 1972; 10 (5): 257-262.
7. Archer M, de Vos B-J, Viser MS. The preparation, assay and certification of aqueous ethanol reference solutions. *Accred. Qual. Assur.* 2007; 12 (3-4): 188-193.
8. Dubowski KM. Manual for Analysis of Ethanol in Biological Fluids, Report No. DOT-TSC-HHTSA-76,4, University of Oklahoma Health Sciences Center 1977; pp. 89-91.
9. King B, Lawn R. International interlaboratory study of forensic ethanol standards. *Analyst* 1999; 124 (7): 1123-1130.
10. Pilone GJ. Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985; 68 (2): 188-190.
11. Szabadváry F. History of Analytical Chemistry. Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach 1992; pp. 254.
12. Chatten LG. (Ed.). *Pharmaceutical Chemistry, Vol. I, Theory and Application.* New York: Edward Arnold 1966; pp. 141-145.
13. Jacques KA, Lyons TP, Keksall DR. *The Alcohol Textbook.* 4th ed.; Nottingham: Nottingham University Press 2003.
14. Hawks RL, Chiang CN. *Urine Testing for Drugs of Abuse, NIDA Research Monograph Series 73;* Maryland: Rockville 1986; pp. 103.
15. Quan C, Li HM, Huang T, Zhang W, Ding Z-T, Shen YX. High-precision analysis of ethanol in bioethanol by gas chromatography with flame ionization detector. *Accred. Qual. Assur.* 2012; 17 (5): 535-541.
16. Seo H-B, Kim H-J, Lee O-K, Ha J-H, Jung K-H. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 36 (2): 285-292.
17. Finlayson ME, Lee DG. Oxidation of ethanol by

- chromium(VI), a kinetics experiment for freshmen. *J. Chem. Educ.* 1971; 48 (7): 473-474.
18. Lanes MR, Lee DG. Chromic acid oxidation of alcohols: A simple experiment on reaction rates. *J. Chem. Educ.* 1968; 45 (4): 269-271.
 19. Bessonneau V, Thomas O. Assessment of exposure to alcohol vapor from alcohol-based hand rubs. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012; 9 (3): 868-879.
 20. Levine B. (Ed.). *Principles of Forensic Toxicology*, 3rd ed.; Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry 2010.
 21. Swift R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. *Addiction* 2003; 98 (S2): 73-80.
 22. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Materials*; London, Chicago: Pharmaceutical Press 2002; pp. 8.
 23. Wilkinson L. Optimum conditions of the acid dichromate method for determining ethanol in body fluids. *Analyst* 1958; 83 (7): 390-396.
 24. Marquez A, Dueñas M, Serratos MP, Merida J. Formation of visitins and anthocyanin flavonol adducts during the red grapes drying. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60 (27): 6866-6874.
 25. Caputi A, Ueda M, Brown T. Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *Am J. Enol. Vit.* 1968; 19 (3): 160-165.
 26. Nicloux M. Dosage de l'alcool éthylique. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1896; 43: 841.
 27. Roche J. Maurice Nicloux, 1873-1945, Titres et travaux scientifiques. Paris: Masson 1904.
 28. Rochat J. Le dosage de l'alcool éthylique sanguin: une modification de la méthode de Nicloux. *Helv. Chim. Acta* 1946; 29 (4): 819-830.
 29. Andréason R, Jones AW, Erik MP. Widmark (1888-1945): Swedish pioneer in forensic alcohol toxicology. *Forensic Sci. Int.* 1995; 72 (1): 1-14.
 30. Krause D, Wehner H-D. Blood alcohol/congeners of alcoholic beverages. *Forensic Sci. Int.* 2004; 144 (2): 177-183.
 31. Ricordel I, Pailler PM, Baquet C, Warnet JM. Le point analytique en matière d'alcoolémie. *Bull. Soc. Franç. d'Alcoolologie* 1990; 12 (3): 114-119.
 32. Friedemann TE. Chemical testing procedures for the determination of ethyl alcohol. *J. Am. Med. Assn.* 1959; 170 (1): 47-71.
 33. Jaulmes P, Mestres R. Dosages des alcools par oxidation. *Chim. Anal.* 1958; 40: 413-424.
 34. Vycudilik W. Historical development of expertise in forensic chemical analysis. General survey, illustrated by case studies from the Viennese Institute. *Fres. J. Anal. Chem.* 2000; 368 (6): 550-552.
 35. Cordebard H. Titrimetric determination of organic substances by chromic acid oxidation. Use of stable nitro-chromic solution. *J. Pharm. Chim.* 1939; 30: 236-272.
 36. Vaubourdolle M. *Toxicologie*, 3eme ed.; Wolters Kluwer S.A. 2007; pp. 205-206.
 37. Freund H. Henri Cordebard, un Pharmacien Célèbre. Vie, Oeuvre, Dosage de l'Alcool dans le Sang. Th. Dipl. D'Etat Dr Pharm. Univ. Nancy I, Fac. des Sciences Pharm. et biol. 1991.
 38. Labrude P. Henri Cordebard et le dosage de l'alcool dans le sang : Hélène Freund, Henri Cordebard, un pharmacien célèbre. Vie, œuvre, dosage de l'alcool dans le sang. *Revue d'histoire de la pharmacie* 1991; 79 (291): 484.
 39. Cordebard H. *Discours Order de la Légion d'Honneur*. Nancy-Paris-Strasbourg: Imprimerie Belger-Levrault 1939.
 40. Labrude P. Les pharmaciens des établissements hospitaliers de Nancy autres que le Centre hospitalier universitaire. *Revue d'histoire de la pharmacie* 1996; 84 (312): 123-125.
 41. Lafont O. *Dictionnaire d'Histoire de la Pharmacie, Société d'Histoire de la Pharmacie*. Paris: Pharmathèmes 2007.
 42. Labrude P. De quelques pharmaciens célèbres, aux noms sur des plaques de Rues ou ignorés par elles, a Nancy et dans l'agglomération nancéienne. *Bulletin des Académie et Société Lorraine des Sciences* 1997; 36 (4): 171-181.
 43. Labrude P. Le professeur Bruntz, la transformation des Ecoles supérieures de pharmacie en Facultés et la question de la création du diplôme d'Etat de docteur en pharmacie. *Revue d'histoire de la pharmacie* 2000; 88 (328): 509-519.
 44. Cordebard H. L'oxydation chromique en analyse quantitative: essais de généralisation des dosages chromométriques des substances organiques, PhD Thèses, Société d'Impressions Typographiques 1941, pp. 405.
 45. Lee DG. Mechanism of the Chromic Acid Oxidation of Alcohols, PhD Thesis, Department of Chemistry, The University of British Columbia 1963.
 46. Guymon JF, Crowell EA. The chemical determination of alcohol in wines and spillage by dichromate. *J. Ass. Off. Agr. Chem.* 1959; 42: 393-398.
 47. Barwick VJ, Ellison SLR. Estimating measurement uncertainty using a cause and effect reconciliation approach. Part 2. Measurement uncertainty estimates compared with collaborative trial expectation. *Anal. Commun.* 1998; 35 (11): 377-383.
 48. King B. Review of the potential of titrimetry as a primary method. *Metrologia* 1997; 34 (1): 77-82.
 49. Williams A. Measurement uncertainty in chemical analysis. *Anal. Proc.* 1993; 30: 248-250.
 50. Hirano K, Masakatsu A. Phenolic resins -100 years of progress and their future. *React. Funct. Polym.* 2013; 73 (2): 256-269.
 51. Sweetman SC. (Ed.). *Martindale, The Complete Drug*

- Reference, 36th ed.; London: The Pharmaceutical Press 2009; pp. 1656-1657.
52. Brian H, Marguerite D. Why celebrate Joseph Lister? *Lancet* 2012; 379: E39-E40.
 53. Weimer WR. Lister Centennial. *J. Chem. Educ.* 1927; 4 (5): 666-668.
 54. Troy DB. (Ed.). Remington. *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ⁿ ed., Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2005; pp. 1087-1088.
 55. Block JH, Beale JM. *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, Philadelphia, PA: 12th revised North American ed. 2010.
 56. Reynolds JEF. (Ed.). *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, 29th ed.; London: The Pharmaceutical Press 1989; pp. 968.
 57. Burgot J-L. *Ionic Equilibria in Analytical Chemistry*. New York: Springer 2012; pp. 373-375.
 58. Trischler F. Quantitative determination of phenols by bromination surveyed from an unusual perspective. *Acta Pharm. Hung.* 2000; 70 (1): 19-22.
 59. Guo G, Lin F. The bromination kinetics of phenolic compounds in aqueous solutions. *J. Hazard. Mat.* 2009; 170 (2-3): 645-651.
 60. Gallard H, Pellizzari F, Croué JP, Leguve B. Rate constants of reactions of bromine with phenols in aqueous solutions. *Water Res.* 2003; 37 (12): 2883-2892.
 61. Clarke JR. The kinetics of the bromate-bromide reaction. *J. Chem. Educ.* 1970; 47 (11): 775-778.
 62. Burgess AE, Latham JL. Kinetics of fast brominations. A potentiometric study. *J. Chem. Educ.* 1969; 46 (6): 371-374.
 63. Cohen R, Matzek C, Schlossec S, Huber CO. Amperometric determination of phenol bromination kinetics. *J. Chem. Educ.* 1981; 58 (10): 823-824.
 64. Koppeschaar WF. Maassanalytischen Bestimmung des Phenols. *Z. Anal. Chem.* 1876; 15: 233-245.
 65. Koppeschaar WF. Volumetric determination of phenol. *Analyst* 1876; 1: 116-117.
 66. Koppeschaar WF. Analyse volumétrique du phénol. *Le Moniteur Scientifique* 1878; 20: 412-417.
 67. Koppeschaar WF. Volumetric estimation of phenol. *Journal of Chemical Society* 1877; 31: 746-747.
 68. Abdulkadir MQ. Proceeding bromometric phenol assay without starch indicator. *Iraqi J. Pharm. Sci.* 2009; 18 (1): 72-75.
 69. Laitinen HA, Harris WE. *Chemical Analysis: an Advanced Text and Reference*, 2nd ed.; New York: McGraw-Hill 1975; pp. 371.
 70. AMC The determination of phenol in soaps. *Analyst* 1946; 71 (7): 301-305.
 71. Kolthoff IM, Belcher R. *Volumetric Analysis. Volume III. Titration Methods: Oxidation-Reduction Reactions*. New York: Interscience Publishers, Inc. 1957; pp. 534-539.
 72. NNBW. Willen Frederik Koppeschaar, *Nieuw Nederlandsch Biografisch Woordenboek*; <http://www.biografischportaal.nl/person/40181450>
 73. Oesper R. Hans Landolt (1831-1910). *J. Chem. Educ.* 1945; 22 (4): 158-162.
 74. Rinard G. Landolt, Hans Heinrich. *En Dictionary of Scientific Biography*, Vol. 7, New York: Charles Scribner's Sons 1973, pp. 619-620.
 75. Landolt H. Bromwasser als Reagens auf Phenol und verwandte Körper. *Berichte der deutschen Chemischen Gessellschaft* 1871; 4: 770-773; *Zeitschrift für analytische Chemie* 1872; 11: 93-96.
 76. Landolt H. Detection of phenol and bodies related thereto by means of bromine-water. *Chem. News* 1871; 24: 217.
 77. Prescott AB, Schimpf HW. *Organic Analysis: A manual of the descriptive and analytical chemistry of certain carbon compounds in common use*, 5th ed., New York: Van Nostrand 1901.
 78. Oesper R. Some famous balances. *J. Chem. Educ.* 1940; 17 (7): 312-322.
 79. Jones AW. Measuring alcohol in blood and breath for forensic purposes –a historical review. *Forensic Sci. Rev.* 1996; 8 (1): 13-44.
 80. Agapejev S, Vassilieff I, Curi PR. Alcohol levels in cerebrospinal fluid and blood samples from patients under pathological conditions. *Acta Neurol. Scand.* 1992; 86 (5): 496-500.
 81. Lister T. One Hundred Tried and Tested Experiments, *Classical Chemical Demonstration* 69. The 'Breathalyzer' Reaction. London: The Royal Society 1995; pp. 174-176.
 82. OIV – Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Resolution OENO 56-2000 V Wine Vineyards – Determination of the residual alcohol content.
 83. AOAC, Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Gaithersburg, MD: AOAC 1997; pp. 28.1-28.3.
 84. Goullé J-P, Lacroix C. Alcoolémie: aspects médico-légaux Blood éthanol in légal médecine. *Journal de médecine légale droit médical* 2000; 43 (1): 54-66.
 85. Gardziella A, Pilato LA, Knop A. *Phenolic Resins: Chemistry, Applications, Standardization, Safety, and Ecology*, 2nd ed.; Berlin: Springer-Verlag 2000; pp. 501.
 86. The United States Pharmacopeial Convention USP 32, NF 27, USP NF 2009 (Spanish translation), Vol. 2, pp. 2580.
 87. *British Pharmacopeia. Volume V*; Her Majesty's The Stationary Office. London: HMSO 2008; 1701-1702.
 88. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis, a Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, 2nd ed.; Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone 2005; pp. 72.



Achievements and struggles in stem-cell investigation research

Title in Spanish: *Logros y conflictos en la investigación con células troncales*

M.^a del Carmen Avendaño López^{1,*}

¹Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: This report describes events, circumstances and conflicts that have surrounded to several researchers protagonists of the advances on the stem cells knowledge along a hundred of years, from the cell immortality dogma to the discovery of tecnicis to produce them to be used in regenerative medicine. At this respect, a brief analysis of the expected outlook for induced human pluripotent cells (iPS) is included and compared with nuclear transfer human stem cells (NT-ESC) and production of human embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT embryos).

RESUMEN: Se relatan circunstancias, peripecias y conflictos que han rodeado a varios de los investigadores que han protagonizado el avance de los conocimientos sobre las células troncales a lo largo de cien años, desde el establecimiento del dogma de la inmortalidad celular hasta las técnicas desarrolladas para obtenerlas y utilizarlas en medicina regeneradora. En este último aspecto, se incluye un breve análisis de las perspectivas previstas para las células pluripotentes inducidas (iPS) en relación con las células troncales producidas por transferencia nuclear (NT-ESC) y la producción de embriones humanos por transferencia nuclear de células somáticas (embriones SCNT).

* **Corresponding Author:** avendano@ucm.es

Received: June 20, 2017 **Accepted:** October 18, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 3 (2017), pp. 321-331

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La **Medicina Reparadora** es una nueva y prometedora estrategia terapéutica basada principalmente en la manipulación de las **células madre o troncales** (*stem cells*). Aunque todavía hay muchas lagunas para explicar su conducta y dar sentido a algunos de los fenómenos “misteriosos” que se observan con estas células, su estudio ha conseguido logros relevantes que están permitiendo entender el desarrollo embrionario temprano y la formación de los órganos, abriendo el camino a su aplicación clínica. Además de estos logros, premiados con frecuencia con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina, estas investigaciones han originado en algunos casos rivalidades, intrigas y fraudes (1).

Aunque la información y la literatura publicada en este campo resulta abrumadora, nos hemos atrevido a hacer una selección para relatar cronológicamente cómo se han ido desarrollando los conocimientos, pero también cuales han sido las circunstancias y peripecias que rodearon a los hombres y mujeres que protagonizaron algunos avances extraordinarios y las que afectaron a los implicados en sus conflictos. Obviamente, los biólogos conocerán sobradamente estos hechos, pero nosotros creemos que esta perspectiva puede interesar a los que no lo son, acercándonos así a la formación humanística que deben tener los científicos (2).

2. EL DOGMA DE LA INMORTALIDAD CELULAR. HISTORIAS RELACIONADAS CON LAS CÉLULAS WI-38

En las ciencias biomédicas se han producido desviaciones del método científico que hoy pueden parecernos increíbles (3). Un ejemplo paradigmático es el dogma de la **inmortalidad celular**, una creencia que fue aceptada por la comunidad científica durante unos 60 años aunque estuvo basada en un único experimento que no pudo reproducirse nunca. Su autor fue **Alexis Carrel** (Figura 1), una de las figuras más controvertidas de su generación por ser partidario de la eugenesia, que fue premiado con el **Nobel de Fisiología o Medicina en 1912** por sus importantes aportaciones al desarrollo de la medicina y la cirugía, especialmente las relacionadas con las anastomosis vasculares, el cultivo de tejidos y el trasplante de órganos, donde la unión de vasos sanguíneos es indispensable para restablecer la circulación (4). Para mantener vivos los órganos fuera del cuerpo humano, también desarrolló una bomba de perfusión extracorpórea en colaboración con el aviador e ingeniero estadounidense Charles Lindbergh.

En enero de 1912, trabajando en la Universidad Rockefeller de Nueva York, Carrel extrajo el embrión de pollo de un huevo y cortó un pequeño fragmento de su corazón con el fin de mantenerlo vivo el mayor tiempo posible. Al poco tiempo anunció que su cultivo era inmortal y que la inmortalidad era inherente a todas las

células (5). Éstas podrían replicarse indefinidamente en un medio de cultivo adecuado, ya que la muerte era la consecuencia de cómo se organizaban en el cuerpo. Aunque las células se morían en todos los laboratorios que quisieron repetir el experimento, dado el enorme prestigio de Carrel, fueron muy pocos los que pusieron en duda su descubrimiento, y la mayoría asumió que el fallo de sus experiencias se debía a alguna contaminación o al empleo de un medio nutritivo inadecuado. Carrel y sus colaboradores aseguraron más tarde que su cultivo se había mantenido vivo durante 34 años, y hubo que esperar a que **Leonard Hayflic** (Figura 1) descubriera en **1962** que solo las células cancerosas son inmortales y que las células somáticas normales (humanas y de animales) tienen una capacidad limitada para replicarse antes de entrar en senescencia.

La historia de este hallazgo comienza por el interés de Hayflick en detectar si los virus causaban cáncer. Para ello necesitaba células humanas normales que pudieran cultivarse en el laboratorio pero, como no le servían las células adultas porque habrían estado expuestas a distintos virus, recurrió a las **células fetales**. En el Instituto Wistar de Filadelfia, donde trabajaba, creó varias cepas de células a partir de un feto procedente de un aborto. En esa época, los abortos eran ilegales en Pensilvania, pero los doctores los realizaban si consideraban que existía una necesidad médica, y Hayflick pensaba que si no utilizaba esos tejidos para sus investigaciones acabarían siendo incinerados. De esta forma desarrolló 25 cepas de células fetales diferentes, que numeró de WI-1 a WI-25. Al cabo de unos meses se extrañó de que las cepas celulares más antiguas empezaran a replicarse más lentamente, incumpliendo la ortodoxia establecida: “las células *in vitro* tratadas adecuadamente se podrían replicar hasta el infinito”.

Todas las cepas sufrieron el mismo proceso y, aunque las células seguían siendo activas metabólicamente, la división terminó después de 50 duplicaciones sin que intervinieran factores extrínsecos. Estos resultados se publicaron en 1961 en la revista *Experimental Cell Research* (6), tras haber sido rechazados por *The Journal of Experimental Medicine* en una carta enviada por **Francis Peyton Rous**, el tercer personaje de esta historia (Figura 1). Los argumentos de esta carta se basaban en el **dogma establecido por Carrel**: “*Anyone who has worked with tissue culture knows that if the cells are provided with the proper milieu in vitro they will replicate indefinitely*”.

Peyton Rous, que había dado nombre al sarcoma de Rous, fue uno de los descubridores del papel de los virus en la transmisión de ciertos tipos de cáncer, por lo que recibió junto a **Charles Brenton Huggins** el **Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1966**. Sus trabajos se completaron por **J. M. Bishop** y **H. E. Varmus** en 1976, al comprobar que los genes responsables de la transformación de las células normales en malignas no eran de origen vírico, sino que estaban presentes en los genomas humanos aunque en un estado no oncogénico, por lo que se les denominó **proto-**

oncogenes. En **1989** se otorgó a ambos el **Premio Nobel de Fisiología o Medicina**.



Figura 1. Alexis Carrel, Leonard Hayflick y Francis Peyton Rous.

Hayflick descubrió posteriormente que **las células del cáncer son inmortales** y que **las células fetales humanas tienen memoria**, de forma que si se congelan después de un número determinado de duplicaciones, cuando se descongelan recuerdan las que habían experimentado previamente, y se duplican hasta un total de 50 divisiones. Estos trabajos se criticaron y ridiculizaron, y solo después de 10 años se aceptó que las células tienen un tiempo de vida limitada *in vitro*, conocido como **límite de Hayflick** (7). Hoy sabemos que este tiempo depende de la actividad de una transcriptasa inversa llamada **telomerasa**, que produce hebras de ADN utilizando como molde hebras de ARN.

En el organismo, la telomerasa está implicada en el alargamiento de los **telómeros**, estructuras de ADN no codificantes que protegen a los extremos de los cromosomas prolongando el tiempo de vida de las células y aumentando su número de divisiones. Esta enzima actúa fundamentalmente en las células germinales embrionarias, y se encuentra reprimida en las células somáticas diferenciadas con la excepción de las hematopoyéticas y epidérmicas. En condiciones fisiológicas normales, la longitud de los telómeros declina con las sucesivas divisiones celulares, hasta que no son capaces de proteger a los cromosomas. Debido a la inestabilidad cromosómica, las células entran entonces en senescencia y finalmente en apoptosis. Cuando una célula somática se maligniza a través de mutaciones, estas reactivan la producción de telomerasa y cuando se dividen el telómero no se acorta (8). Esta es la razón por la que las células cancerosas son inmortales y por la que los inhibidores de telomerasa se han estudiado para el tratamiento del cáncer (9).

Continuando con nuestro relato sobre Hayflick, en 1962 el Instituto Nacional del Cáncer patrocinó al Instituto Wistar y lo contrató como co-investigador principal “*to produce, characterize, store and study human diploid cell strains and to distribute such cell strains to all qualified investigators*”. Hayflick obtenía en esos momentos tejidos fetales del Director del Departamento de Virología del Instituto Karolinska de Suecia, donde el aborto era legal. De uno de los pulmones que recibió de dicho Instituto, Hayflick y el citogenetista Paul Moorhead obtuvieron la cepa WI-38, cuyas células han ayudado a salvar muchas

vidas al permitir aislar, cultivar y manipular diversos virus para el desarrollo de vacunas, como los poliovirus causantes de la poliomielitis. A la vacuna contra la poliomielitis A le siguieron otras que inmunizaron en los años sesenta y setenta a muchos millones de personas contra rubéola, rabia, paperas, y hepatitis A. La mayoría de las células que se utilizaban experimentalmente en esos años, como las famosas células HeLa, procedían de distintos tipos de cáncer por lo que eran genéticamente anormales. En contraposición, las **células WI-38** eran células humanas “normales” y podían estar disponibles en cantidad, aunque dada su procedencia podían ser éticamente discutidas.

Hayflick donó las células WI-38 a los fabricantes de vacunas, ya que entonces las células vivas no podían patentarse, pero tuvo problemas con los responsables del control de vacunas del Instituto Nacional del Cáncer, precursor de la FDA, que advertían un posible peligro si las células mutaban y se volvían cancerosas. El desarrollo de las células WI-38 se había realizado sin aportaciones económicas gubernamentales o privadas, y el investigador terminó su contrato cuando se trasladó a Stanford en 1968. Su laboratorio continuó allí investigando cómo las células humanas en cultivo mantenían la memoria del número de divisiones que habían realizado y en 1975 demostró, junto con el estudiante **Woodring E. Wright**, que este contador celular se localiza en el núcleo. Puede decirse que Hayflick comenzó los estudios acerca de **cómo envejecen las células** (10), pero también fue el primero en aislar el *Mycoplasma pneumoniae* y demostrar que era un agente causante de la neumonía atípica primaria (11).

En Stanford, la demanda de células WI-38 continuaba, por lo que Hayflick empezó a cobrar para sufragar los transportes, ingresando al parecer las ganancias en una cuenta hasta que se decidiera su destino. En 1976 las instancias oficiales consideraron esta actitud un robo al Gobierno Federal y lanzaron serias alegaciones contra él, llegando a confiscar el material congelado almacenado en sus laboratorios. Hayflick inició un pleito contra el Gobierno de EEUU y, tras seis años de litigio, llegó a un acuerdo por el que le fueron devueltos parte de las células confiscadas y los fondos recibidos por su transporte (al parecer pagó con ellos los gastos del pleito). Personalmente, tuvo la satisfacción de recibir el apoyo de 85 científicos que, en un artículo que publicó la revista *Science* en 1982, objetaron la conducta del NIH y de la FDA (12). Hayflick ha manifestado la creencia de que este enfrentamiento facilitó que los científicos obtuvieran los derechos de propiedad intelectual y que muchos se hayan convertido en emprendedores

3. CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES, CÉLULAS MADRE ESPECÍFICAS DE TEJIDO Y CÉLULAS MADRE TUMORALES. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS. TRANSDIFERENCIACIÓN. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Poco después de la fertilización de un óvulo, la agrupación de células que forman el trofoblasto, el embrioblasto y la cavidad blastocelular forman el llamado blastocisto, del que derivará el embrión humano. De él pueden aislarse las **células troncales embrionarias** (*embryonic stem cells*, **ES cells**), también denominadas **células troncales pluripotentes (PSCs)** porque son capaces de producir cualquier tipo de célula de un organismo adulto cuando se dividen. Las **células madre adultas**, que se encuentran en fetos en desarrollo, en niños y en adultos, se conocen con el nombre de **células madre específicas de tejido**, porque son capaces de formar solamente uno o dos tipos de tejido. Actualmente se conocen cerca de 20 tipos de estas células en el individuo adulto, y su misión es regenerar tejidos desgastados, como la piel y la sangre, o dañados como el hígado. Las más conocidas y empleadas en clínica son las **células madre hematopoyéticas de la médula ósea**. En los últimos años se ha identificado un pequeño número de células en distintos tipos de tumores con características de células madre pluripotentes; son autorrenovables y pueden diferenciarse para originar todos los tipos de células que se encuentran en un cáncer particular. Estas **células madre tumorales** (*cancer stem cells*) son más resistentes a los tratamientos convencionales utilizados en oncología, y se les atribuye la capacidad de originar, expandir y producir las metástasis y las recidivas (13).

Tradicionalmente, se había asumido que los procesos de desarrollo y diferenciación celular eran irreversibles. El biólogo **Conrad Hal Waddington**, en su famoso “*The Waddington’s epigenetic landscape*”, representó gráficamente este concepto en 1957 situando una célula madre en la cima de una colina con mucha pendiente. Al descender, la célula había adquirido una identidad epigenética celular irreversible y no podía volver atrás (14). Este dogma quedó en entredicho cuando el biólogo británico **John Bertrand Gurdon** (Figura 2), al que sus maestros en la escuela consideraron demasiado estúpido para estudiar ciencias, descubrió que al reemplazar el núcleo de una célula del ovocito de una rana por el de una célula del intestino de otra rana madura se desarrollaba un renacuajo normal. Se trataba de la primera clonación de un animal adulto, y significaba que el ADN de la célula madura tiene toda la información necesaria para desarrollar todas las células del animal. Es decir: **aunque las células madre adultas son especializadas, la especialización es reversible** (15). Esta técnica iniciada por Gurdon se denominó **transferencia nuclear de células somáticas** (*somatic cell nuclear transfer*, SNCT), y le valió para compartir con **Shinya**

Yamanaka (Figura 2) el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2012.

La **plasticidad celular** recibió un espaldarazo en 1979, cuando se describió que los fibroblastos tratados con el agente desmetilante del ADN 5-azacitidina (AzaC) se transformaban en mioblastos, precursores de células de músculo esquelético (16). Esta reprogramación, en la que una célula madura se convierte en otro tipo celular también diferenciado, se denomina **transdiferenciación**. **Andrew Lassar** y **Harold Weintraub** pensaron que los mioblastos transdiferenciados anteriormente mencionados debían expresar algún factor específico de células musculares, lo que les llevó al descubrimiento y clonaje del **factor de transcripción Myod**, demostrando que su introducción en fibroblastos inducía su transdiferenciación a células musculares (17). Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias específicas de ADN, controlando la transcripción de la información genética del ADN al ARN mensajero.

En 1998, se cultivaron por primera vez las **células madre embrionarias humanas** (18), despertando la esperanza de encontrar **nuevos tratamientos para muchas enfermedades** como el Parkinson, el Alzheimer o la diabetes. Pero, aunque con ellas se han realizado experimentos relevantes, su uso se considera en general éticamente reprobable dado que solo pueden extraerse de embriones humanos. Entre los muchos biólogos que investigaban en esos años si era posible transformar en el laboratorio una célula adulta en una célula pluripotente sin necesidad de producir un embrión clonado, nos encontramos al equipo liderado por **Yamanaka** en la Universidad de Tokio. El año **2006**, más de 40 años después de los descubrimientos de Gurdon, este equipo demostró que es posible dicha transformación, ya que las células del tejido conectivo de ratones podían reconvertirse en células inmaduras capaces de originar distintos tipos de célula tras adicionarles un cóctel de cuatro genes denominado **OSKM**. Estos genes codifican los **factores de transcripción Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4** (19), llamados desde entonces **factores de Yamanaka**. En el año **2007**, el mismo equipo demostró que puede reprogramarse de igual forma cualquier célula adulta del cuerpo humano y producir así **células madre pluripotentes inducidas (iPS)** (20).

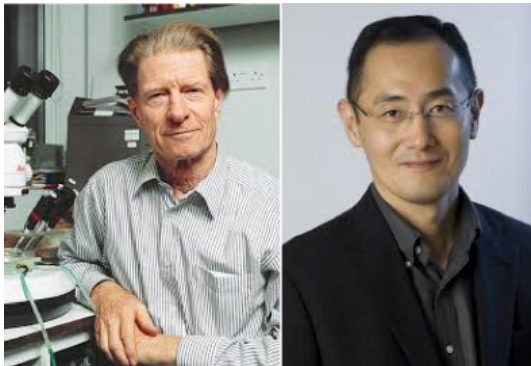


Figura 2. John Bertrand Gurdon y Shinya Yamanaka.

Las técnicas modernas han permitido conocer el estado de la cromatina en las células madre pluripotentes y los cambios epigenéticos que se producen durante la reprogramación celular. Para que se produzca correctamente la reprogramación de una célula somática a una célula iPS se tienen que perder marcas epigenéticas típicas de la célula somática, y adquirir las modificaciones que permitan la pluripotencia celular. Una marca epigenética que está “instalada” en las células somáticas y es clave en la generación de células iPS es la metilación del ADN. Durante la reprogramación, la activación endógena de genes pluripotentes como **Oct4** se produce por la desmetilación de sus regiones promotoras, habiéndose comprobado que una desmetilación global insuficiente da lugar a una reprogramación parcial. La **primera reprogramación de células en el interior de un organismo vivo** (un ratón transgénico), realizada en **2013** por el Grupo de Supresión Tumoral del CNIO liderado por **Manuel Serrano**, ha demostrado que en ella están implicados los mismos factores que en la reprogramación *in vitro*, pero además, tiene lugar un daño celular por el que las células entran en senescencia y empiezan a segregar ciertos factores, como la interleuquina 6, que promueven la reprogramación de las células vecinas (21).

4. LA OVEJA DOLLY Y LA CLONACIÓN HUMANA TERAPÉUTICA

La técnica de transferencia nuclear iniciada por Gurdon permitió a los biólogos **Ian Wilmut** y **Keith Campell**, que trabajaban en el Instituto Roslin de Edimburgo, realizar la clonación de una oveja a partir de una célula adulta ya diferenciada (Figura 3).



Figura 3. Ian Wilmut y Keith Campell.

Como ya se ha comentado, en la técnica de transferencia nuclear se elimina el núcleo de una célula somática de cualquier tipo, salvo óvulos o espermatozoides, y se introduce en una célula de un ovocito cuyo núcleo se ha eliminado previamente. En la **oveja Dolly**, la célula somática procedía de la glándula mamaria de una oveja de seis años cuyo núcleo se transfirió a un óvulo no fecundado y enucleado. Después de la transferencia, el núcleo puede reprogramarse adicionando factores que lo empujan a actuar como el

núcleo de un huevo fertilizado o cigoto, y empieza a dividirse tras someterlo a un ligero estímulo eléctrico formando un blastocisto que se implanta en un animal hospedador (otra oveja en este caso), donde se desarrolla hasta que se produce el nacimiento. Hay que mencionar que Dolly fue el único cordero resultante de 277 transferencias.

Con este animal nació también una revolución científica y social; se clonaron primero ratones, y luego vacas, cabras, cerdos, caballos, perros, hurones y camellos (22). Desafortunadamente, muchos de los animales clonados adultos mostraban cambios genéticos que parecían hacer inviábiles a las futuras generaciones y, además, sus telómeros tenían el mismo acortamiento que mostraban las células somáticas cuyo núcleo se había extraído. Éste fue el caso de Dolly, sacrificada a los seis años de su nacimiento a causa de un cáncer de pulmón. Parecía que el reloj biológico se había reiniciado de forma incompleta; sin embargo, la discusión parece que se ha cerrado con la demostración de que los animales clonados no tienen necesariamente una vejez acelerada, y parece existir un mecanismo natural incorporado a los óvulos que es capaz de rejuvenecer una célula (23).

Como no podía ser de otro modo, tras la clonación de mamíferos le llegó el turno a la **clonación humana**, que supone la producción asexual de un ser humano con una carga genética casi idéntica a la de un individuo ya existente. Tradicionalmente se ha distinguido la **clonación reproductora** de la **clonación terapéutica**. En la primera, se pretende la creación de un nuevo ser humano nacido a partir del embrión clonado, mientras que en la segunda se pretenden desarrollar nuevos tratamientos para las enfermedades. Las células pluripotentes de los blastocistos de embriones clonados derivados de un paciente podrían utilizarse en teoría para reemplazar sus tejidos dañados, sin que se produzca el rechazo por su sistema inmune. Muchos científicos son entusiastas respecto a estas técnicas, pero otros piensan que supondrían más perjuicios que beneficios. Entre los primeros se encuentra **Robert Lanza** (Figura 4), actualmente Presidente del *Astellas Institute for Regenerative Medicine* en Massachusetts (dentro de la compañía japonesa Astellas Pharma).

Esta historia podría comenzar en los años 2001 y 2002, cuando el Dr. **J. B. Cibelli** (figura 4) y sus colaboradores describieron un primer intento de clonación de embriones humanos (24). Su éxito fue muy relativo porque solo lograron obtener mediante la técnica de transferencia de núcleos tres embriones humanos que no llegaban a desarrollarse más allá del estadio de 6 células. Por eso tuvo un gran impacto la publicación en 2004 y 2005 de los trabajos realizados en la Universidad Nacional de Seúl por el Dr. **Woo-suk Hwang** (Figura 4) y colaboradores, comunicando la obtención de muchos embriones clónicos humanos por transferencia nuclear de una célula somática, y la derivación de líneas celulares a partir de las células troncales pluripotentes de sus blastocistos (25). Esta noticia provocó un terremoto en el mundo científico y

médico, porque abría la puerta a la **clonación terapéutica**. En la primera de estas publicaciones se comunicaba que estas líneas celulares, denominadas SCNT-hES-1, eran capaces de diferenciarse para dar embrioides *in vitro* y de formar *in vivo* teratomas en ratones inmunodeprimidos conteniendo derivados celulares de las tres capas embrionarias germinales. Después de su proliferación, eran idénticas genéticamente a las células somáticas que habían donado su núcleo, aunque no se excluía por completo la posibilidad de que tuvieran un origen partenogenético (que procedieran de un óvulo sin germinar). En la segunda publicación, se informaba que habían creado 11 líneas celulares humanas troncales embrionarias (hESC) a partir de 31 blastocistos de embriones obtenidos por transferencia de los núcleos de células de la piel de pacientes afectados por diversas enfermedades a ovocitos humanos. Estas células, transferidas al donante del núcleo o a otro individuo, se establecían rápidamente.

El gobierno surcoreano otorgó a Hwang 3 millones de dólares para que pudiera seguir con sus investigaciones durante cinco años, poniéndolo al frente del primer banco mundial de células madre. En mayo de 2004, la revista *Nature* denunció que algunos de los ovocitos utilizados en las investigaciones de Hwang habían sido donados por científicas de su laboratorio, pero fueron más trascendentes otras denuncias, particularmente la de que nueve de las once líneas celulares que decía haber creado eran falsas y que las otras dos eran células madre embrionarias tomadas de su laboratorio. En enero de 2006, una comisión de investigación promovida al efecto por la Universidad de Seúl, comunicó que había encontrado **graves fallos en los procedimientos, pruebas simuladas y datos falsos** y, lamentando “un acto grave que daña la base de la ciencia”, confirmó que el experimento de clonación de embriones humanos era fraudulento, y que la mayor parte del material genético utilizado en las clonaciones no coincidía con el ADN del supuesto donante. Sin embargo, confirmó como válida la clonación de un perro anunciada por Hwang en la revista *Nature* en agosto de 2005 (26). Hwang dimitió como profesor de dicha universidad en diciembre del 2005, la revista *Science* publicó un editorial retractándose de los dos artículos en Junio de 2006 (27), y su editor en jefe afirmó en un comunicado que consideraría incluir nuevos requisitos para la publicación de artículos e informes por parte de los científicos, como detallar las contribuciones específicas de todos los implicados en la investigación enviada y firmar declaraciones en las que afirmaran estar de acuerdo con las conclusiones de sus respectivos artículos. Esta última exigencia pretendía sin duda evitar una práctica bastante común: la de incluir como coautores de un trabajo a investigadores de renombre en un área determinada. Corea del Sur prohibió además la investigación con células madre embrionarias hasta que en marzo de 2007 levantó el veto con la condición de utilizar solo óvulos descartados de inseminaciones artificiales.

El objetivo de lograr la clonación terapéutica parece

más próximo desde que en el año 2013 el científico de origen ruso **Shoukhrat Mitalipov** (Figura 4), continuando con sus estudios con primates en el Centro Nacional de Oregón para la investigación de Primates, lograra obtener un embrión humano del que derivaron células madre (28). Para ello utilizó una solución enriquecida con cafeína de óvulos de gran calidad procedentes de voluntarias sanas a los que retiró el núcleo, introduciendo después en su citoplasma el núcleo de un fibroblasto de un paciente con síndrome de Leigh, finalizando con su electroestimulación (29). La cafeína es un inhibidor de las fosfatasa y es efectiva para prevenir la activación prematura de los ovocitos durante el proceso de transferencia nuclear. El portal Internet PubPeer, una plataforma en la que se pueden trasladar opiniones de forma anónima sobre estudios científicos, acusó a **Mitalipov** y a los autores de este trabajo de haber repetido imágenes y de confundir los tipos celulares que se mostraban con pies de fotos erróneos, pero se ha concluido que los autores solo incurrieron en pequeños errores en el proceso de preparación de los datos y no hay fallos que tengan impacto en los hallazgos científicos de la investigación (30).



Figura 4. José Cibelli, Robert Lanza, Woo-suk Hwang y Shoukhrat Mitalipov.

Respecto a las distintas técnicas que pueden utilizarse para obtener células pluripotentes útiles en la Medicina Reparadora, hay que decir que las células IVF-ES representan al “patrón oro”, pero son alogénicas para los pacientes y presentan problemas éticos. La obtención de células iPS no requiere disponer de un óvulo, pero su aplicación clínica está actualmente plagada de escollos ya que son a menudo defectuosas en su diferenciación, contienen patrones aberrantes de metilación, y adquieren mutaciones somáticas. Hasta el momento, el procedimiento de Mitalipov parece una alternativa más costosa que la obtención de células iPS por el procedimiento de Yamanaka, pero puede que sea más productiva. El grupo de Mitalipov ha comparado genéticamente las células IVF-ES con las NT-ES y las iPS, encontrando que las dos últimas contenían una comparable cantidad de variaciones en el número de copias *de novo*, pero los perfiles de reparación del ADN y del transcriptoma de las NT-ES se correspondían con los de las células IVF-ES mientras que diferían en las iPS, que mantenían patrones residuales de metilación del ADN similares a los de las células de las que procedían (31). En conclusión, las células somáticas humanas pueden ser reprogramadas a la pluripotencia con mayor fiabilidad utilizando las células NT-ES, y la clonación con fines

terapéuticos es idónea para la medicina regeneradora.

Uno de los objetivos prioritarios de la Medicina Regeneradora es la generación de **células productoras de insulina** para tratar la diabetes, y en su búsqueda se están empleando tanto las técnicas de clonación como la técnica de Yamanaka modificada. El año **2014**, científicos del *New York Stem Cell Foundation Research Institute* y del *Silberman Institute of Life Sciences* de Jerusalén, consiguieron **células β pancreáticas transformando las células troncales de embriones humanos clonados** procedentes de un ovocito. El núcleo de éste se reemplazó por el de una célula de la piel de una paciente de 33 años con diabetes tipo 1 (32). Cuando estas células se trasplantaron a ratones deficientes en células β , éstos lograron controlar la glucosa. En un futuro, se pretende estudiar esta estrategia con pacientes diabéticos fabricando las células β a partir de las “propias células del paciente” y el ovocito de una donante. Actualmente, las células productoras de insulina que se trasplantan a pacientes diabéticos proceden de cadáveres y su cantidad es limitada. Además, han de administrarse junto a fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo, ya que el sistema inmunológico de los diabéticos tipo 1 las destruye. Es posible que las células obtenidas por clonación humana sean mejor aceptadas por el sistema inmune, aunque todavía no se sabe con certeza.

Éste y otros hallazgos procedentes de estudios de clonación humana sugieren que podría ser inminente algo que advierten hace tiempo la Iglesia Católica y otros defensores del derecho a la vida: que los científicos comiencen a crear indiscriminadamente embriones humanos a petición del consumidor. Con la técnica de Mitalipov no se ha logrado todavía clonar monos y, por tanto, tampoco se podrían clonar personas, pero la **clonación humana** ya no parece una idea tan descabellada: si ya se ha conseguido con éxito un embrión, el siguiente paso podría ser implantarlo en un útero y crear un clon.

En cuanto a la técnica de Yamanaka, aunque los científicos habían conseguido producir células pre-beta, éstas no eran funcionales porque las células β pancreáticas humanas requieren una maduración post-natal para que segreguen la máxima cantidad de insulina en respuesta a la glucosa. El año **2016**, un equipo del Instituto Salk de California liderado por **Ronald Evans** buscó la existencia de algún factor clave que determinara el paso de una célula pre-beta inmadura a una célula β madura y funcional, descubriendo que la expresión del receptor γ vinculado a los receptores estrogénicos (**estrogen-related receptor, ERR γ**) es una característica de las células β adultas. La inducción postnatal de la proteína ERR γ activa la fosforilación oxidativa mitocondrial, la cadena de transporte electrónico y la producción de ATP, necesarias para la secreción de insulina en presencia de glucosa. De acuerdo con este descubrimiento, cuando se añadió ERR γ a células pre-beta creadas en el laboratorio por la técnica de Yamanaka, se comprobó que respondían a la glucosa y producían insulina *in vitro* (33). Estas células trasplantadas

a ratones deficientes en células β , fueron capaces de revertir la diabetes, pero no se sabe todavía si funcionarán en humanos.

5. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Cuando un organismo empieza a desarrollarse, el blastocisto sufre un proceso llamado **gastrulación** que lo transforma en una estructura sólida con tres capas que van a dar lugar a tres partes del organismo adulto diferentes. El sistema nervioso, por ejemplo, es inicialmente una delgada tira de tejido situada en la capa externa o ectodermo que se engrosa y expande, plegándose sobre sí misma, para originar lo que finalmente será el cerebro, la médula espinal, la retina y la neurohipófisis, mientras que el resto del ectodermo originará los tejidos epiteliales y las células de la cresta neural.

Las investigaciones sobre el desarrollo embrionario del cerebro comenzaron en los años **1920** con los estudios sobre la conversión de embriones de rana en renacuajos realizados por el alemán **Hans Spemann**. Éste encontró que al dividir en dos uno de estos embriones solo daba lugar a un renacuajo la mitad que contenía una porción de tejido que organizaba la gastrulación. Esta porción de tejido se denominó “**organizador de Spemann**” o labio dorsal, que en los vertebrados determina la posición de la médula espinal. En otros experimentos, Spemann trasplantó tejidos de embriones de tritón a embriones de salamandra, o viceversa, observando que al transferir el tejido organizador se formaba un *body axis* secundario y finalmente un segundo sistema nervioso. En estos últimos experimentos fue trascendental el trabajo de la entonces doctoranda **Hilde Proescholdt** (de casada **Hilde Mangold**, Figura 5) que, utilizando huevos de especies de salamandra que difieren en su pigmentación, demostró la inducción de gemelos siameses y comprobó que el segundo sistema nervioso procedía del tejido del animal hospedador, no del donante, lo que significaba que el tejido organizador inducía de algún modo la formación de tejido nervioso en las células vecinas a él (34). Todas estas investigaciones fueron la base para la concesión a Spemann del **Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1935**, galardón que no pudo compartir Hilda Mangold por su fallecimiento prematuro, ocurrido el mismo año en que se publicaron sus resultados.



Figura 5. Hans Spemann y Hilde Mangold.

A partir de 1924, los embriólogos asumieron que el organizador de Spemann secreta una proteína que induce la formación del sistema nervioso, e intentaron encontrarla durante casi 70 años. A principios de 1990 dos equipos de investigación observaron que el organizador de Spemann segregaba dos proteínas distintas: **folistatina**, una glicoproteína aislada del líquido folicular ovárico que se expresa en casi todos los tejidos de los animales superiores, y **nogina**, cuyas funciones están asociadas al desarrollo de la cabeza embrionaria (35). Sorprendentemente, en vez de inducir alguna actividad, estas proteínas revertían el bloqueo de otro grupo de proteínas que en condiciones normales evita que las células del ectodermo se conviertan en neuronas inmaduras, originando en su lugar tejido epitelial. Esto quiere decir que las neuronas inmaduras se producen gracias a que folistatina y nogina impiden que el ectodermo origine exclusivamente tejidos epidérmicos (36).

En 1994 **Yoshiki Sasai** (Figura 6), graduado en Medicina en la Universidad de Kyoto en 1986, se incorporó como investigador posdoctoral al laboratorio del embriólogo **Edward De Robertis** en la Universidad de California Los Angeles, donde trabajó hasta 1996. De Robertis había hecho sus estudios posdoctorales con Gurdon, en el *Medical Research Council* del Reino Unido, y junto con **Walter Gehring**, había aislado en 1984 el **gen Hox-C6**, que controla el desarrollo de los vertebrados y determina la diferenciación entre la parte anterior (cabeza) y la posterior (cola) (37). A los pocos meses de su llegada a California, Sasai había participado en el aislamiento del **gen cordina** (38), que produce otra proteína del mismo nombre. Segregada por células dorsales, la cordina facilita el transporte de factores de crecimiento a la región ventral del embrión donde, tras ser digerida por una proteasa, los libera. Este fenómeno determina la diferenciación entre la región dorsal y ventral en muchos animales (39).

Tras su vuelta a Japón, los éxitos científicos del equipo de Sasai en sus esfuerzos para imitar el desarrollo de los órganos *in vitro* fueron notables. Haciendo crecer células troncales embrionarias de ratón en un entorno tridimensional, y utilizando medios de cultivo específicos para los distintos tejidos, las células se organizaban espontáneamente de manera análoga a lo que ocurre en los embriones en crecimiento. De este modo, el equipo fue capaz de generar una copa óptica (cuya pared interna da lugar a la retina en el desarrollo embriológico del ojo), algunas partes del córtex cerebral, los rudimentos de un cerebelo, y tejido de glándula pituitaria. En el primer caso, el experimento se repitió partiendo de células troncales embrionarias humanas, generando células epiteliales que crecieron casi en el mismo orden en que lo hicieron las de ratón, aunque la copa óptica “humana” tenía un tamaño mucho mayor. Primero formaron una vesícula, luego una bolsa, y luego la copa óptica con una pared externa (el epitelio de la retina) y una interna con una estructura multicapa con múltiples tipos de células

entre las que se encontraban células fotorreceptoras (sensibles a la luz) (40). El propio Sasai mostraba su asombro ante la autoorganización de las células con estas palabras: “*We still can't explain why the cells come together to make an eye. There must be more principles that we still don't understand yet. It's something that makes me completely in awe of life*”.

En el año 2014 el equipo de la oftalmóloga **Masayo Takahashi**, siguiendo las pautas de Sasai, implantó por primera vez en el interior del ojo de una paciente con degeneración macular una lámina del **pigmento epitelial de la retina** que se había diferenciado a partir de células iPS originadas por reversión al estado pluripotente de fibroblastos de la piel (41). Un año más tarde, el trasplante permanecía intacto y la agudeza visual no había mejorado, pero tampoco empeorado (42). Un equipo de Corea del Sur, que utilizó una técnica análoga en cuatro pacientes asiáticos, tampoco observó después de un año serios efectos secundarios relacionados con estos trasplantes (43). Actualmente se han extendido las tecnologías que permiten separar y manejar las células que se desean para construir tejidos biológicos *in vitro*, así como las aplicaciones clínicas de éstos (44).



Figura 6. Yoshiki Sasai.

6. LA TRAGEDIA DE LAS CÉLULAS STAP (*STIMULUS-TRIGGERED ACQUISITION OF PLURIPOTENCY*).

Los fraudes científicos pueden deberse en algún caso a un exceso de confianza u orgullo personal, pero es más probable que hayan sido la consecuencia de un hábito que se ha ido adquiriendo. El investigador quiere demostrar que está en lo cierto y que el trabajo y el dinero invertidos están justificados, lo que supone que sigue siendo competitivo. El problema es que apearde de esos hábitos parece difícil. Afortunadamente, la experimentación científica es muy eficaz a la hora de demostrar los errores y de corregirlos, como demuestra la historia de las células Stap.

Sasai había colaborado en el año 2000 a la creación del Centro para el Desarrollo Biológico (C.D.B.) dentro del prestigioso Instituto Riken en la ciudad de Kobe, y con su prestigio ayudó a mantener su financiación. RIKEN es la abreviatura de su primitivo nombre: *Rikagaku Kenkyujo*, que significa literalmente: "Instituto de Investigación Física y Química" y se remonta a 1917 (45). Semejante en cierta medida al Consejo Superior de Investigaciones

Científicas español, fue relevante durante la segunda Guerra Mundial porque el ejército japonés llevó a cabo en algunas de sus instalaciones el programa para fabricar su bomba atómica. Tras muchas vicisitudes, RIKEN se ha expandido desde los años 80 creando nuevos laboratorios y centros en Japón y en el extranjero.

Con el tiempo, **Sasai** empezó a colaborar en una tecnología basada en someter las células ordinarias a estrés. Aparentemente, las células que sobrevivían a ciertos estímulos externos como una bajada transitoria de pH podían transformarse en células madre, lo que implicaba que habían adquirido la pluripotencia. Se podrían conseguir, sin necesidad de una transferencia nuclear ni de adicionar factores de transcripción, células madre adultas genéticamente idénticas en apenas media hora. Este presunto descubrimiento sugería la existencia en el organismo de un mecanismo que hacía posible la regeneración de partes del cuerpo sin riesgo de rechazo por el sistema inmune y sin los problemas éticos de las células troncales embrionarias, por lo que estaba llamado a revolucionar la medicina regenerativa. Sasai era supervisor de **Haruko Obokata** (Figura 7), una joven de 31 años que investigaba en el competitivo mundo de las células madre. Tras lograr el título de *Bachelor of Science* en 2006 y finalizar sus estudios en el Departamento de Química Aplicada de la Escuela de Ciencias e Ingeniería, obtuvo en 2008 el título de *Master of Science in Applied Chemistry* en la Universidad de Waseda, realizó dos años de investigaciones dirigidas al estudio de células madre en la *Harvard Medical School* de Boston bajo la dirección de **Charles Vacanti** (Figura 7), y regresó a la Universidad de Waseda para completar en 2011 su doctorado en Ingeniería como investigadora invitada en el C.D.B., del que fue nombrada responsable del Laboratorio para la Reprogramación Celular en el año 2013.



Figura 7. Haruko Obokata, Charles Vacanti y Teruhiko Wakayama.

Realmente, la idea de desarrollar las células Stap había surgido a principios de los años 2000 de la imaginación de Charles Vacanti. Este investigador tenía, además de otros tres hermanos médicos como él, un hermano que nació con síndrome de Down, lo que le motivó a pensar en la posibilidad de aumentar su capacidad mental extrayendo células de su cerebro, eliminando en ellas la copia extra del cromosoma 21 que las caracteriza, y volviéndolas a inyectar. Decidió utilizar primero células madre aisladas de tejido neuronal con la ayuda de su hermano Martin, pero ninguno de los dos tenía experiencia previa en esta labor. Quizás por eso, al observar la transformación de

células adultas en unas células semejantes a esporas tras ser sometidas a un intenso estrés, postularon la hipótesis de que éstas podrían sobrevivir en condiciones extremas, desarrollarse, y diferenciarse en células con las características propias del tejido del que fueron aisladas. Estas células podrían permanecer dormidas en un organismo hasta que se activaran por algún daño induciéndolas a regenerar el tejido dañado (46). Fue entonces cuando Charles Vacanti incorporó a su laboratorio de Boston a Haruki Obokata, conocida como una auténtica “manitas” en las técnicas de laboratorio.

Entusiasmada con la idea de su mentor, desarrolló su tesis concluyendo que estas células eran capaces de originar teratomas, lo que indicaba que eran pluripotentes. Para publicar estos resultados en una revista importante contactaron con el Dr. **Teruhiko Wakayama** (Figura 7), que entonces trabajaba en el C.D.B., proponiéndole la creación de un **ratón quimérico** que se originaría tras la inyección de células alteradas por el estrés en un embrión de ratón. Utilizando la técnica que creó a la oveja Dolly, Wakayama había encontrado el modo de producir 581 ratones sanos, clones de un “donante” original, a través de 25 clonaciones consecutivas. Esto fue posible gracias a que su grupo había observado que **en las histonas de las células naturales la acetilación de las histonas persiste a lo largo de toda su vida, mientras que en los núcleos somáticos las histonas se desacetilan completamente**. Esto supone una disfunción en el control epigenético, que hace a su ADN difícilmente accesible durante la división celular, por lo que la adición de inhibidores de histona desacetilasa promueve el desarrollo del estadio de blastocisto. Wakayama superó la inviabilidad de sus ratones administrando a las células clonadas el inhibidor de histona desacetilasa tricostatina A (47, 48).

Vacanti, Obokata y Wakayama enviaron los resultados de estos trabajos a la revista *Nature*, pero su publicación se rechazó argumentando que **no estaba probado que las células procedían de la conversión de células adultas**, y que quizás las muestras se habían contaminado con células madre embrionarias. La impaciencia y aspiraciones de estos científicos crecieron cuando en otoño se concedió el Premio Nobel a Yamanaka. Surgieron discrepancias entre los miembros del grupo y finalmente Sasai, que tenía entonces 52 años y era el subdirector del Centro, se convenció del interés del trabajo y de que con su ayuda como supervisor de Obokata se podría publicar. Fue entonces cuando estas células fueron bautizadas como **células Stap (*Stimulus-triggered acquisition of pluripotency*)**, se incorporó un nuevo protocolo utilizando como agente productor de estrés ácido clorhídrico en vez del ATP que se utilizaba con anterioridad, se realizó algún experimento adicional, y se grabó un video de cámara rápida en el que las células del ratón se transformaban cambiando de un color gris a uno verde. A principios del año 2014, estos resultados originaron dos publicaciones en la revista *Nature* (49). En el resumen de la primera de ellas se decía literalmente: *Through real-time imaging of STAP*

cells derived from purified lymphocytes, as well as gene rearrangement analysis, we found that committed somatic cells give rise to STAP cells by reprogramming rather than selection. STAP cells showed a substantial decrease in DNA methylation in the regulatory regions of pluripotency marker genes. Blastocyst injection showed that STAP cells efficiently contribute to chimaeric embryos and to offspring via germline transmission. We also demonstrate the derivation of robustly expandable pluripotent cell lines from STAP cells. Thus, our findings indicate that epigenetic fate determination of mammalian cells can be markedly converted in a context-dependent manner by strong environmental cues.

Obokata fue ensalzada como la nueva Madame Curie japonesa. Sin embargo, cinco meses después, todos los investigadores que intentaron replicar estas experiencias habían sido incapaces de hacerlo, por lo que las dos publicaciones mencionadas tuvieron que retractarse (50). En principio, Obokata negó haber fabricado sus resultados manteniendo que había conseguido células Stap en más de 200 ocasiones y sus colaboradores la apoyaron, pero poco a poco todos fueron retractándose hasta que finalmente también lo hizo ella. Se había demostrado que en el estudio se acumulaban textos plagiados y fotos manipuladas y, lo más importante: que las supuestas células madre estaban contaminadas con células madre embrionarias, de forma que los ratones quiméricos y los teratomas que derivaban supuestamente de las células Stap se debían a estas últimas. La investigadora mantuvo que alguien podría haberlas tomado de un refrigerante y etiquetarlas mal por error.

Uno de los coautores más afectados por estos hechos fue Yoshiki Sasai que, tras estar hospitalizado por depresión, se suicidó junto a su laboratorio el 5 de agosto de 2014. En su sepelio, el entonces Presidente de RIKEN, **Ryōji Noyori (Premio Nobel de Química del año 2001)** dijo: *“The scientific world has lost a talented and dedicated researcher, who earned our deep respect for the advanced research he carried out over many years.”*

Una de las tres notas de despedida que dejó Sasai iba dirigida a Obokata. En ella le pedía que asegurara que las células Stap podían reproducirse, por lo que el Instituto Riken le permitió que intentara reproducir su trabajo bajo la supervisión estricta de varios investigadores. En diciembre tuvo que admitir que se habían falsificado y fabricado los datos y que las llamadas células Stap eran células troncales embrionarias, sin poder demostrar si la contaminación era o no accidental. El Instituto admitió que había fallado el sistema de supervisión del CDB, despidió a Obokata, e introdujo cambios radicales en su organización que incluyeron un recorte del 40% de su financiación y el cierre de muchos laboratorios. En noviembre de 2015 la Universidad de Waseda, que había fijado el 31 de octubre como plazo para que Obokata corrigiera su tesis, le retiró el doctorado.

El final de esta historia nos recuerda a la tragedia griega, que cumplía su función educativa tratando de conmovier a los espectadores a través, por ejemplo, de la

némesis que los dioses infligían a los mortales dominados por la soberbia.

7. AGRADECIMIENTOS

La autora quiere expresar su agradecimiento al Dr. Lacadena, que se prestó amablemente a comentar esta revisión y a proporcionarme algunos datos, además de influir con sus escritos y conferencias en su interés por la genética y el desarrollo de la vida humana.

8. REFERENCIAS

- Judson HF. "Anatomía del fraude científico". Editorial Barcelona: Crítica, 2006.
- Baquero F. "Quince citas con la Ciencia". Conmemoración del decimoquinto aniversario de la Fundación Lilly en España, 2017.
- Avendaño C. Reflections about the scientific process. *An Real Acad Farm.* 2017; 83: 6-9.
- Aida L. Alexis Carrel (1873–1944): visionary vascular surgeon and pioneer in organ transplantation. *J Med Biorg.* 2014; 22: 172-5.
- Carrel A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med.* 1912; 15: 516-8.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1961; 25: 585-621.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1965; 37: 614-36.
- a) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70. b) Shay JW, Gazdar AF, Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol.* 2004; 50: 106-9.
- Avendaño C, Menéndez JC. Telomerase inhibitors and other anticancer approaches targeting telomeres. En "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs", (second edition), Ed. Elsevier 2015; Chapter 7, pág. 311-6.
- a) Wright WE, Hayflick L. The regulation of cellular aging by nuclear events in cultured normal human fibroblasts (WI-38). *Adv Exp Med Biol.* 1975; 61: 39-55. b) Hayflick L. "How and Why We Age". Ballantine Books Reprint ed. 1996; ISBN 0-345-40155-7.
- Hayflick L, Stanbridge E. Isolation and identification of mycoplasma from human clinical materials. *Ann New York Acad of Sciences* 1967; 143: 608-21.
- Hayflick L. NIH Settlement. *Science* 1982; 215: 240-2.
- Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 340-56.
- Moris N, Pina C, Martínez A. Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nat Rev Genetics* 2016; 17: 693-703.
- a) Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182: 64-5. b) Gurdon JB. The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*. *Developmental Biology* 1962; 6: 68-83.
- Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; 17: 771-9.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987-1000.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
- Mosteiro L, Pantoja C, Alcázar N, *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 2016; 354: aaf4445.
- Nisar A, Wani U, Wernery FAH, *et al.* Production of the First Cloned Camel by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biol Reprod.* 2010; 82: 373-9.
- Sinclair KD, Corr SA, Gutierrez CG, *et al.* Healthy ageing of cloned sheep. *Nature Commun.* 2016; 7: 12359.
- a) Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, *et al.* Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *E-biomed: The Journal of Regenerative Medicine* 2001; 2: 25-31. b) Cibelli JB, Lanza RP, West MD, Ezzell C. The first human cloned embryo. *Scient Amer.* 2002; 286: 42-9.
- a) Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, *et al.* Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303: 1669-74. b) Hwang WS, Roh S, Lee BC, *et al.* Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005; 308: 1777-83.
- Lacadena JR. Fraudes científicos: Ética de la investigación. En "Genética y Bioética", Página web del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Abril, 2006). <http://ntic.educacion.es/w3/tematicas/genetica>.
- Kennedy D. Editorial Expression of Concern. *Science* 2006; 311: 36.
- Lacadena JR. ¿Un paso adelante hacia la clonación humana con fines terapéuticos? *An Real Acad Farm.* 2013; 79: 241-52.
- Masahito Tachibana, Paula Amato, Michelle Sparman, *et al.* Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 2013; 153: 1228-38.
- Lacadena JR, ¿Un paso adelante hacia la clonación humana con fines terapéuticos?: una agenda. *An Real Acad Farm.* 2014; 80: 644-8.

31. Ma H, Morey R, O'Neil RV, *et al.* Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 2014; 511: 177-83.
32. Yamada M, Johannesson B, Sagi I, *et al.* Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* 2014; 510: 533-6.
33. Yoshihara E, Z, CS, *et al.* $ERR\gamma$ Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells. *Cell Metabolism* 2016; 23: 622-34.
34. Spemann H, Mangold H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Roux's Arch Entw Mech.* 1924; 100: 599-638.
35. Oppenheimer SB. The Discovery of Noggin. *The American Biology Teacher* 1995; 57: 264-6.
36. Lumsden AG, Davies AM. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 1983; 306: 786-8.
37. Carrasco AE, McGinnis W, Gehring WJ, De Robertis EM. Cloning of a *Xenopus laevis* gene expressed during early embryogenesis that codes for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes: implications for vertebrate development. *Cell* 1984; 37: 409-14.
38. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert, *et al.* *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 1994; 79: 779-90.
39. a) Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of Chordin to BMP-4. *Cell* 1996; 86: 589-98. b) Piccolo S, Agius E, Lu B, *et al.* Cleavage of Chordin by the Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* 1997; 91: 407-16. c) De Robertis EM. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 296-302.
40. a) Stem cells: Human eye parts in a dish. *Nature* 2012; 486: 297.
b) Nakano T, Ando S, Takata N, *et al.* Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 771- 85. c) Cyranoski D. *Nature News* 2012: 10835.
41. Reardon S, Cyranoski D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* 2014; 513: 287-8.
42. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, *et al.* Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 2017; 376: 1038-46.
43. Song WK, Park K-M, Kim H-J, *et al.* Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Reports.* 2015; 4: 860-72.
44. Arai T, Arai F, Yamato M. *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems.* Springer Japan 2015; eBook ISBN: 9784431552970.
45. Tsuji T (Ed.). *Laboratory for Organ Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan. "Organ Regeneration Based on Developmental Biology".* Springer Singapur 2017; ISBN: 9789811037689.
46. Vacanti MP, Roy A, Cortiella J, Bonassar L, Vacanti CA. Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *J Cell Biochem.* 2001; 80: 455-60.
47. Yoshida M, Kijima M, Akita M, *et al.* Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem.* 1990; 265:17174-9.
48. S, Kohda T, H, *et al.* Successful Serial Recloning in the Mouse over Multiple Generations. *Cell Stem Cell* 2013; 12, 293-7.
49. a) Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M, Vacanti CA. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 2014; 505: 641-7. b) Obokata H, Sasai Y, Niwa H, *et al.* Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature* 2014; 505: 676-80.
50. a) Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, *et al.* Retraction: Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 2014; 511: 112. b) Obokata H, Sasai Y, Niwa H, *et al.* Retraction: bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature* 2014; 511: 112.



The Hungarian contribution to iodometric methods, Karoly Than and Winkler Lajos, the determination of dissolved oxygen and the iodo index

Title in Spanish: *La aportación húngara a los métodos iodométricos, Karoly Than y Lajos Winkler, la determinación de oxígeno disuelto y el índice de iodo*

Purificación Sáez Plaza¹, Julia Martín¹, Agustín G. Asuero^{1*}

¹Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla.

ABSTRACT: Under the background of the iodometric methods we analyze the life and work of two great Hungarian scientists, Than and Winkler, teacher and disciple. They were responsible for the introduction of scientific chemistry and pharmaceutical education in his country, which moved in the orbit of the Austro-Hungarian Empire. Both generated a school of excellence in the academic field. Than contributes among many other discoveries to the use of potassium biiodate for the standardization of sodium thiosulfate and Winkler develops an iodometric method for the determination of dissolved oxygen in waters, a classic of chemical analysis, the use of which continues today. The use of potassium dichromate by Zulkovsky opened the possibility to the analytical applications of the oxidations with dichromate in iodometry. The iodide, bromide and iodine index determinations, make the analytical chemistry of halogens a distinctive branch of Hungarian science. Schulek, a disciple of Winkler, opens the door to the development of pharmaceutical analysis and the pharmaceutical industry in Hungary.

RESUMEN: Tras el trasfondo de los métodos iodométricos se procede a analizar la vida y la obra de dos grandes científicos húngaros, Than y Winkler, maestro y discípulo, responsables de la introducción de la química científica y de la educación farmacéutica en su país, que se movía en la órbita del imperio austro-húngaro, generando una escuela de excelencia en el ámbito académico. Than contribuye entre otros muchos descubrimientos a la utilización del bi-iodato potásico para la estandarización de tiosulfato de sodio. Winkler pone a punto un método iodométrico de determinación del oxígeno disuelto en aguas, un clásico de la química analítica, todavía en uso hoy día. El uso del dicromato de potasio por Zulkovsky abre la posibilidad a las aplicaciones analíticas de las oxidaciones con dicromato en iodometría. Las determinaciones de yoduro y bromuro y la del índice de yodo, entre otras, hace que la química analítica de los halógenos pueda considerarse una rama distintiva de la ciencia húngara. Schulek, discípulo de Winkler, abre las puertas al desarrollo del análisis y de la industria farmacéutica en Hungría.

*Corresponding Author: asuero@us.es

Received: October 10, 2017 Accepted: October 18, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 3 (2017), pp. 332-342

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de los métodos iodométricos en el desarrollo del análisis volumétrico ha sido fundamental, así como la aportación de destacados farmacéuticos a este tema de estudio, objeto de la Tesis Doctoral de Sáez-Plaza (1). El primer departamento químico en Hungría se crea en 1763 en la famosa academia minera (2-3) de Selmebánya, donde se llevan a cabo ejercicios de laboratorio de química analítica. En este trabajo se aborda el estudio de la vida y obra de dos grandes científicos húngaros, Than y Winkler, que operan bajo el paraguas del imperio austro-húngaro, responsables de la introducción de la química científica y de la educación farmacéutica de su país, bajo el telón de fondo de los métodos iodométricos de análisis. La escuela de Than (4-5), organizador, maestro y científico ejemplar, y Winkler, farmacéutico y discípulo, aporta excelentes profesores e investigadores universitarios. Than goza de una educación privilegiada junto a Bunsen y Wurtz, tras sus estudios realizado en Viena, y de vuelta a su país, fruto

de las vicisitudes históricas acontecidas en 1860, vive el tránsito en la universidad del alemán al húngaro, lo que le permite llegar a profesor, recomendado por sus mentores. La importancia del Instituto de Química de la Universidad de Budapest lo convierte en un auténtico referente. Winkler nos lega un método de determinación de oxígeno disuelto en agua (6), ya clásico, todavía en uso. Los halógenos son objeto de atención por parte de los científicos húngaros hasta tal punto que puede decirse sin exageración que la química analítica de estos elementos es una ciencia distintiva húngara.

2. KAROLY THAN Y LA INTRODUCCIÓN DE LA QUÍMICA CIENTÍFICA Y DE LA EDUCACIÓN FARMACÉUTICA EN HUNGRÍA

La investigación sistemática y organizada de la química y de la educación farmacéutica en Hungría comienza (4-12) con Than. Natural de Óbese (hoy Serbia), se alista a los 15 años en el ejército húngaro durante la revolución de 1848-49. Tras la derrota se interrumpe (13)

el proceso de “Magyarization”, y el lenguaje de la enseñanza vuelve a ser de nuevo el alemán. El uso del húngaro se consideró un acto revolucionario hasta 1860, cuando el emperador Francisco José permite su reintroducción en las escuelas. Than se emplea como aprendiz de farmacia en varias ciudades húngaras, ya que al concluir la guerra su madre había muerto y su padre se había arruinado financieramente. Uno de los farmacéuticos le ayuda a completar sus estudios en la escuela secundaria de Szeged. Acude becado a la Universidad de Viena, a estudiar farmacia en la Facultad de Medicina, aunque se pasa a la de Artes Liberales, para estudiar química. En 1858 concluye su doctorado, bajo la dirección del químico orgánico Josef Redtenbacher (1810-1870), con quien había estudiado en Praga, Theodor Wertheim (1820-1864) (antecesor de Than en Budapest).

A continuación, Than estudia química en Heidelberg, con Bunsen (aunque también física con Kirchoff y matemáticas con Cantor), y también en París, con Charles-Adolphe Wurtz (1817-1884), donde contacta con los químicos franceses. De retorno a Viena se convierte en asistente de Redtenbacher y se orienta hacia la química-física y la gasometría. En 1860 es nombrado profesor de la

Universidad de Budapest, sucediendo a Theodor Wertheim (1820-1864), que marcha a la Universidad de Graz, al ser austriaco y carecer de la necesaria fluidez en la lengua húngara (13), que se reintroducía ese mismo año en las universidades húngaras.

Than fue recomendado para el puesto por Bunsen, Redtenbacher, y el propio Wertheim, quien cuando retorna a Viena habla muy bien y con mucha reverencia de las capacidades de Than. En 1872, año en que contrae matrimonio con Ervina Kleinshmidt (y del que vienen 5 hijos), Than crea el primer Instituto de Química en la “Pest University” de Budapest, que adquirió fama en toda Europa. Than, miembro de la Academia de Ciencias de Hungría, de la que llegó a ser Vicepresidente (Presidente de la sección de matemáticas y ciencias naturales durante 25 años) representa un papel importante en el desarrollo de la química en las universidades húngaras, siendo un referente para muchas generaciones de químicos, médicos y farmacéuticos. Sus resultados fueron tenidos en cuenta en otras instituciones de Europa y de Estados Unidos. Once de sus estudiantes llegaron a convertirse en profesores universitarios (13).



Figura 1. Karoly Than (1834-1908). Museo Nádasi András de materiales didácticos para ilustrar el aprendizaje de la Química; http://www.tanszertar.hu/eken/2007_02/na_0702.htm.



Figura 2. Juego de pesas (izquierda) y mercurio (derecha) de Than Karoly (1834-1908). Museo Nádasi András de materiales didácticos para ilustrar el aprendizaje de la Química; http://www.tanszertar.hu/eken/2007_02/na_0702.htm.

Than (Figura 1) fue una pieza clave en la fundación de la revista húngara de química “Magyar Chemiai Folyóirat” (9), contribuyendo incluso con fondos de su propio peculio personal. Estuvo comprometido (Figura 2) con la enseñanza y didáctica de la química (14). Vicepresidente de la Sociedad Húngara de ciencias naturales de 1862 a 1872, y Presidente, de 1872 a 1880. Fue miembro de la Casa Superior del Parlamento. El nuevo edificio de química en Trefort Garden, que todavía se encuentra en uso, puede considerarse como su última obra. Muere muy pronto tras su retiro, concediéndosele el título de Barón (8).

Fue editor de las dos primeras farmacopeas (15-16) húngaras. A Than se debe también la introducción del bicarbonato de potasio como estándar para acidimetría y alcalimetría (17-20). Than recomienda, ya en 1865, antes de publicarse la teoría iónica de Arrhenius, expresar los resultados de los análisis en función del porcentaje de cada constituyente (21), en lugar de hacerlo en forma de sales. Este procedimiento sólo se adopta en la práctica general tras recomendación de Ostwald, quien en su segunda edición de la obra “Los Fundamentos Científicos de la Química Analítica” (22) agradece con una nota a pie de la pág. 220 la anterior sugerencia de Than:

“Dieser Ausweg ist schon lange, noch vor der Aufstellung der Ionentheorie, von C. Than vorgeschlagen und später an einer Reihe von Beispielen praktisch durchgeführt worden” (Trad.: Esta solución ha sido propuesta desde hace tiempo, previa al establecimiento de la teoría iónica, por C. von Than, y se ha llevado a la práctica en una serie de ejemplos).

Los métodos de análisis de gases de Than eran precisos y los de análisis volumétrico fueron internacionalmente reconocidos y aceptados.

Than (23) redacta la obra “Elementos de química

experimental” obra magna para la que había recogido información durante 25 años. Szabadvary y Szökefalvi-Nagy (24) comentan

“Had this book not been published in Hungarian but in a better-known language, it would surely be recorded among the greatest books in the history of chemistry”

La primera parte de la obra (13), influenciada por la Química General (25) de Wilhelm Ostwald, estaba dedicada a la química-física, y cubría los temas fundamentales, valencia y equivalente, composición química, mecánica química (cinética y afinidad), y energética (termodinámica), termoquímica, electroquímica... Al final de la misma se recogía un bosquejo de la historia de la química y de la literatura química contemporánea. En la segunda parte se describían los elementos con detalle, clasificándolos en metales y no metales. En la tercera, se mostraba un resumen preciso de los compuestos inorgánicos, siguiendo un sistema propio, basado en el principio de analogía (15) entre los diferentes grupos de compuestos que son

“equally composed and have similar chemical features”

Esta de todas formas no fue la primera obra publicada, ya que previamente Lajos Ilosvay, discípulo suyo, publica su primer libro en 1880, dedicándoselo a su maestro Than, y Béla Lengyel publica otra con el sistema de Than, lo que causó cierto malestar entre el maestro y su antiguo alumno.

Than (26-27) también escribió un “practicum” para estudiantes de farmacia que contenía los elementos de análisis cualitativo y cuantitativo, y otro libro sobre análisis químico con una introducción teórica y una descripción de las reacciones químicas. Su producción científica global ha sido puesta recientemente (28) en línea, correspondiéndose con una versión previa impresa sobre “La vida y el trabajo de Karoly” publicada en 2008 por la Academia de Ciencias de Hungría.

El uso de la disolución de tiosulfato sódico en iodometría, en aquella época, se hizo general. Sin embargo, su estandarización constituía en un grave problema, ya que las sustancias utilizadas hoy día con ese propósito no eran accesible comercialmente en un estado de pureza suficiente. La única estandarización posible era el uso de iodo, siendo entonces su purificación complicada e insuficiente.

Than introduce el uso de bi-iodato de potasio (29, 19), suministrando así un método mucho más simple para llevar a cabo la estandarización. Tras el bi-iodato de potasio se utilizan ácido iódico (30) y más tarde iodato de potasio (31), en la estandarización del tiosulfato de potasio. En 1874 Mohr usa por primera vez una mezcla de iodato y ioduro (en exceso), para determinar ácidos (32-33). Esa misma mezcla utiliza Kjeldahl en la valoración del exceso de ácido (34-35) en el acabado analítico de su famoso método.

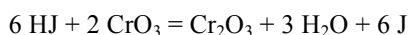
3. ZULKOWSKI Y EL USO DEL DICROMATO DE POTASIO

Un método conocido y aplicado para la determinación de ácido crómico consiste (4-5) en calentar el cromato con ácido clorhídrico concentrado, pasando el cloro desprendido a través de una disolución de ioduro de potasio, midiéndose a continuación el iodo formado con una disolución 0,1 N de tiosulfato de sodio. La destilación del cloro es a la vez engorrosa e innecesaria (36), ya que el ácido crómico se reduce con facilidad en presencia de ioduro de potasio. Si se añade una disolución de dicromato potásico a otra de ioduro de potasio no se percibe reacción alguna. Sin embargo, al añadir gota a gota ácido clorhídrico el resultado es la aparición inmediata de iodo, que se disuelve dependiendo de la cantidad de ioduro de potasio en el medio, o se deposita en forma de polvo. Zulkovsky (36) expresa esto de la forma

“Es ist eine längst bekannte und vielfach geübte Methode, die Chromsäure in der Weise zu bestimmen, dass man das betreffende Chromat mit concentrirter Salzsäure erhitzt und das entweichende Chlor in eine vorgelegte Jodkaliumlösung leitet. Das ausgeschiedene Jod wird durch eine Zehntel normallösung von unterschwefligsaurem Natron gemessen, deren Menge zugleich das Maass für die Quantität der Chromsäure bildet.

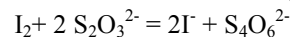
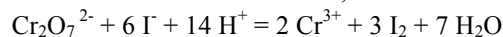
Ich habe gefunden, dass die jedenfalls umständliche Chlordestillation vollkommen überflüssig ist, weil die Chromsäure in wässriger Lösung durch Jodwasserstoff mit Leichtigkeit reducirt wird. Giebt man zu einer Lösung von Kaliumbichromat eine genügende Menge Jodkalium, so ist keine Reaction wahrzunehmen, fügt man jedoch Salzsäure tropfenweise zu, so entsteht sofort eine Ausscheidung von Jod, welches je nach der Quantität des Jodkaliums, gelöst bleibt oder auch in Pulverform abgeschieden wird.”

El proceso químico se puede expresar por la siguiente ecuación:

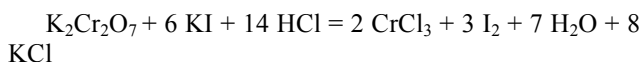


Resulta posible entonces una nueva determinación iodométrica de ácido crómico y sus sales, ya que la cantidad de iodo formado se puede determinar con facilidad con la ayuda de tiosulfato sódico.

En términos modernos se tiene, en forma iónica



o en forma molecular



Un peso fórmula de dicromato potásico origina 3 moles de iodo que requieren 6 moles de tiosulfato de sodio. Luego 1 mol de tiosulfato se corresponde con 1/6 mol de dicromato, por lo que una disolución 0,1 N de tiosulfato, que contiene 24,819 g de la sal pentahidratada por litro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) se corresponde con 1/60 mol de dicromato, esto es $294,185/60 \text{ g} = 4,903 \text{ g}$, teniendo en cuenta los pesos atómicos actuales. El punto final viene dado por la desaparición del intenso color azul que forma el iodo con el almidón en presencia de cloruro; el color de la disolución pasa al de la sal de cromo(III), verde. El establecimiento por Zulkovsky (36) de que bajo ciertas condiciones experimentales el dicromato de potasio reacciona estequiométricamente con ioduro de potasio fue un importante descubrimiento en iodometría, al abrir la posibilidad a las aplicaciones analíticas de las oxidaciones con dicromato. Karl Zulkovsky (1833-1901) fue profesor ayudante de la Universidad de Wien y, más tarde (9), profesor de tecnología química en la Universidad de Brünn, actual Brno (República Checa), que entonces formaba parte del imperio austro-húngaro. Algunas sustancias orgánicas pueden oxidarse o descomponerse con dicromato, por lo que a partir de la cantidad de dicromato consumido puede encontrarse la cantidad de sustancia orgánica analizada. Resichauer (37-38) fue el primero en aplicar el método para la determinación de alcoholes metílico y etílico. El exceso de dicromato se determinaba con sulfato de Fe(II) y permanganato.

4. UNA ANOTACIÓN SOBRE LOS ESTUDIOS DE FARMACIA EN HUNGRÍA

Los estudios regulares de farmacia en Hungría (39-41) comenzaron en 1770 con la fundación de la Facultad de Medicina en la “Nagyszombat University”. Los primeros graduados en farmacia datan de 1771. El número de estudiantes creció de forma gradual; en los primeros años académicos eran 4-7, después 8-12, y más tarde, en 1786, el número llegaba ya a 24. En los años 30 del siglo pasado su número era de 70-80, y después de 1945 unos 150-160 estudiantes cursaban farmacia en la Universidad, y en la actualidad unos 120. Al principio se impartía un curso a los estudiantes de farmacia, y más tarde estos cursos tenían 2 años académicos de duración y más adelante 4. Esta relativamente corta formación universitaria suministraba una buena base para la futura profesión de los estudiantes de farmacia y muchos de ellos podían acrecentar notablemente sus conocimientos si lo deseaban. Entre ellos hubo muchas figuras sobresalientes, que llegaron a

adquirir fama mundial como científicos, incluso como artistas. Muchos fueron honrados con premios académicos y contratados en diversas universidades desempeñando (39, 41) una actividad científica y didáctica excelente.

5. ASPECTOS DE LA VIDA Y OBRA DE LAJOS WINKLER, FARMACÉUTICO

Lajos Winkler (1863-1939) (Figuras 3 y 4) es una de las grandes personalidades de la química analítica en Hungría (4-5, 42-51). Nace en Arad (de una familia de nueve hermanos), donde es aprendiz de farmacia. Estudia farmacia en Budapest, y tras graduarse permanece en la Universidad como asistente de Than. Tras la muerte de éste, el Instituto se divide en dos partes, encargándose Winkler de la cátedra de analítica (la otra, era la de farmacología). Director del primer Departamento de Química de la Universidad de Budapest durante más de 25

años. Winkler, al contrario que Than, su maestro, no participó de forma regular en el trabajo de sociedades científicas. Aparece de cuando en cuando entre los editores de revista, aunque no de forma duradera. Celoso de su tiempo, se guardaba de invertirlo en obligaciones relacionadas con la vida pública y social científica. Trabajaba de noche (de 6 p.m. a 6 a.m.) porque (42)

“during the day a man of an institute is unable to work, being troubled all the time”.

Impartía las clases de 2 a 3 p.m., dedicándose de 3 a 6 p.m. a los asuntos de gestión del Instituto. Era considerado raro por su modo de vida, aunque confiesa a un discípulo

“I am not as crazy as I look, moreover, I am not crazy at all, I only play the crazy man otherwise they would not let me live”



Figura 3. Lajos Winkler (1863-1939). Az egyetemi gyógyszerészképzés kialakulása és fejlődése. <http://mek.oszk.hu/02100/02185/html/993.html> (La formación y el desarrollo de la formación universitaria farmacéutica).

Como resultado de su dedicación publica 242 trabajos, 150 de ellos en alemán, en las revistas de más alto "standing" (45). Winkler abrió nuevos horizontes en química analítica, destacando sus aportaciones (46) en gravimetría de elevada precisión, análisis de aguas y de gases, y de productos farmacéuticos. Los métodos que elabora se resumen en la contribución publicada en Stuttgart (1931-1936) en la serie "Die chemische Analyse" XXIX y XXX (52). Advierte la importancia de mantener estrictamente las condiciones experimentales prescritas en todos los métodos reproducibles. La aplicación del principio de reproducibilidad, en química analítica (y otras ciencias), constituye uno de sus objetivos más importantes. Obtiene resultados analíticos importantes con unos medios muy escasos y limitados. La mayor parte de sus trabajos originales trata (4-5) sobre la determinación de oxígeno en agua, índices de yodo y de bromo, absorción de amoniaco en disolución de ácido bórico, y determinación de cloro y yodo en agua.

Winkler participó en la preparación de los volúmenes II-IV de la Pharmacoepa Hungarica (46), de la que Than era editor en jefe. Su sentido práctico y habilidad crítica le permiten crear técnicas duraderas, en particular valoraciones colorimétricas para la determinación de

metales y contaminantes en aguas.

Winkler escribió una serie de libros, la mayor parte de ellos en alemán, describiendo principalmente sus propios métodos. Su *Handbok* acerca de las investigaciones químicas de laboratorio fue internacionalmente reconocido. También escribió la sección de análisis de aguas en la edición final del Handbook analítico técnico de Lunge-Berl. Winkler fue uno de los mayores exponentes del análisis clásico, probablemente el más completo de los científicos (4-5), en su época, en este campo. Tenía cierta aversión por los métodos físico-químicos de análisis, posiblemente porque consideraba a la química analítica como un arte antes que una ciencia, y opinaba que las artes no pueden someterse a automatización. Sostenía que al igual que un sastre necesita una máquina de coser, es necesario disponer una cierto equipo básica, admitiendo no obstante que el equipo más fino no puede sustituir la destreza y la inteligencia de un químico experto. Miembro correspondiente de la Academia de Ciencias de Hungría en 1896, y numerario en 1922. En 1933 contrae una neumonía y septicemia, de la cual nunca se recupera completamente, empeorando gradualmente su salud, falleciendo en 1939.

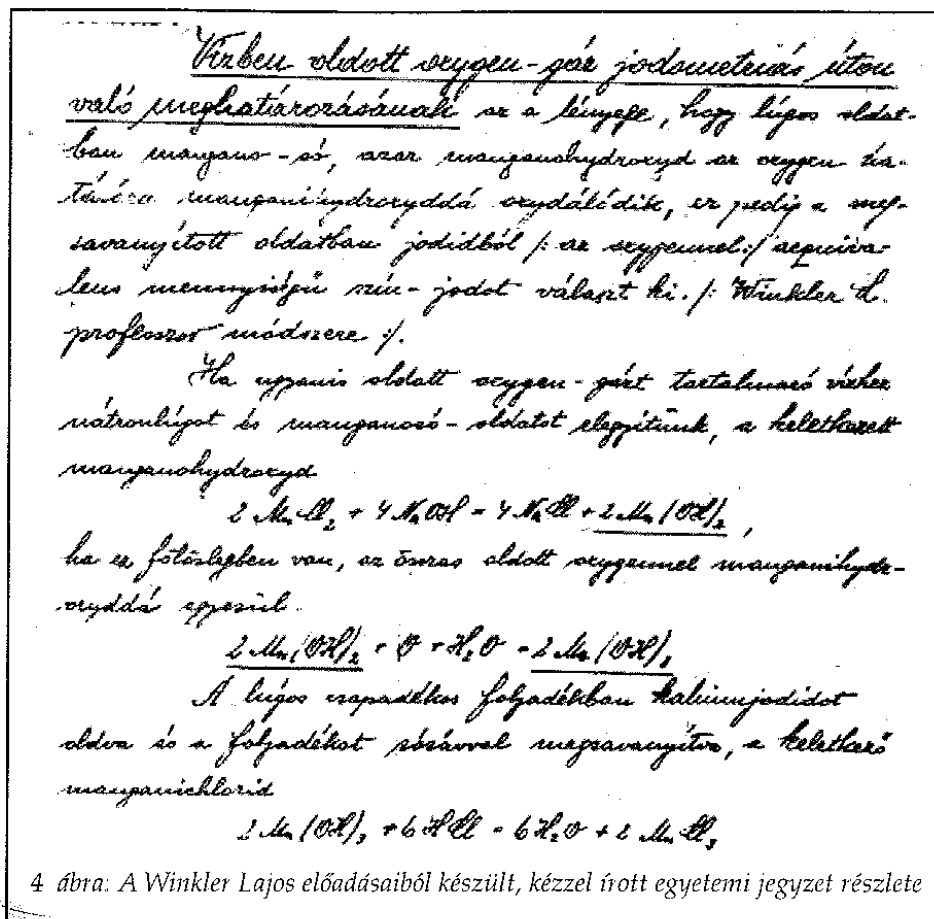


Figura 4. Detalles manuscritos de una de las conferencias de Lajos Winkler (Majoros y Mazak, Acta Pharmaceutica Hungarica 2010, 80, 81-92, p. 85).

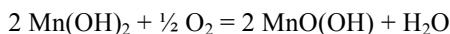
6. LA DETERMINACIÓN IODOMÉTRICA DE OXÍGENO DISUELTO EN AGUAS

Winkler desarrolla a la edad de 25 años, mientras realiza su tesis doctoral sobre la determinación de oxígeno en agua "A vizben felodott oxigén meghatározása", un método de determinación de oxígeno disuelto en agua, todavía en uso (6, 53-55), y que publica en alemán en *Berichte* (56). En la Figura 5 se muestra la primera página del trabajo. El método se conoce como determinación iodométrica de Winkler. Utiliza como reactivo cloruro de manganeso en medio alcalino, en lugar del sulfato de hierro(II), recomendado por Mohr. Elimina la acción oxidante del aire y lleva a cabo el resto de las operaciones en recipiente cerrado. Sus resultados no concordaban con los de Bunsen, que determinaba la capacidad del agua de absorber el aire mediante un método manométrico. Winkler estaba tan seguro de su método, que repitió las experiencias de Bunsen, encontrando de esta manera que dichos valores no eran exactos.

El método se resume en esencia en cuatro reacciones químicas. En primer lugar, se añade una sal de manganeso a la muestra objeto de estudio en disolución de ioduro alcalina, precipitando la sal como hidróxido conforme a la reacción

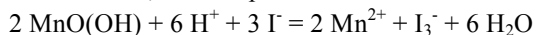


El precipitado se oxida rápidamente por el oxígeno disuelto en la muestra a un hidróxido de manganeso de estado de oxidación más elevado

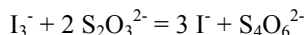


Existe cierto grado de incertidumbre acerca del estado de oxidación real del manganeso en esta reacción. Esto es irrelevante, sin embargo, dado que el manganeso es simplemente un portador de electrones entre el oxígeno y el yodo en el proceso global. La reacción que debe llevarse a cabo a pH mayor de 9, requiere tan solo de unos segundos para completarse (57).

Tras la acidificación de la muestra, el precipitado de hidróxido se redisuelve, liberándose el manganeso en estado de oxidación superior, que oxida el ioduro a yodo, y en exceso de ioduro, se tiene para la reacción neta



Este paso es particularmente crítico en el método de Winkler debido a la potencial pérdida de yodo por evaporación. El yodo formado (ión triioduro) se valora a continuación con disolución patrón de tiosulfato de sodio, utilizando almidón como indicador



Al principio, Winkler utilizaba muestras de 1000 mL en las experiencias. Tras modificar y mejorar la técnica original redujo el volumen de muestra a 100 mL. Un

importante requerimiento para lograr resultados correctos es usar siempre material de vidrio de ajuste (esmerilado) con tapones de vidrio, para evitar que se formen burbujas de aire durante la determinación, tapando las muestras antes de que se forme el MnO(OH) .

Conviene tener en cuenta (58) una serie de consideraciones:

1. La concentración de ioduro debe ser elevada para asegurar la conversión rápida y completa del yodo en ión triioduro, no volátil (un exceso siete veces superior al menos).

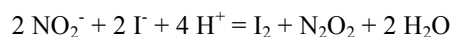
2. El pH óptimo para la reacción (de liberación del yodo) se sitúa entre 2,0 y 2,6. Si el sistema es más ácido, existe la posibilidad de que se oxide al aire parte del exceso de ioduro a yodo

3. Los reactivos deben ser lo suficientemente puros como para prevenir el consumo de yodo por reacciones laterales, y deben estar exentos de oxígeno molecular.

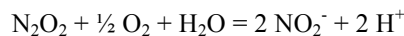
4. La transferencia de materiales debe mantenerse en un mínimo.

Desde su irrupción, hace unos 130 años, el método de Winkler se ha convertido en un procedimiento estándar para la determinación del oxígeno molecular disuelto en agua. El método es sensible, cuantitativo y relativamente simple, lo que explica su enorme popularidad a lo largo de los años. Sin embargo el método no está exento de problemas (59-61), y entre sus inconvenientes se encuentra la necesidad de disponer de muestras relativamente grandes, el hecho de que el procedimiento es lento, y no puede utilizarse para monitorizar el oxígeno disuelto de forma continua. Varias especies disueltas interfieren con las reacciones expuestas, entre ellas, Fe(II), Fe(III), sulfito, tiosulfato, politionato, cloro, hipoclorito y compuestos orgánicos diversos.

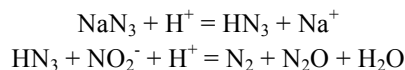
El nitrito de las muestras de agua causa interferencia (62) al oxidar el ioduro



El N_2O_2 es oxidado durante la valoración por el oxígeno que contiene la muestra



Como resultado, se obtienen resultados erróneos elevados, y no es posible la determinación del punto final. En la modificación con azida, se añade NaN_3 con el reactivo alcalino, destruyéndose el nitrito si se encuentra presente



526. Ludwig Wilhelm Winkler: Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes.

(Vorgelegt in der k. ung. Akademie der Wissenschaften durch
Herrn Prof. C. v. Than, am 16. April 1888.)

[Eingegangen am 2. October; mitgetheilt in der Sitzung von Hr. Sell.]

Die zur Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes angewandten Methoden, als Bunsen's¹⁾ gasometrisches Verfahren oder die Schützenberger'sche Titirung²⁾ mit Natriumhydrosulfit, sind ihrer schwierigen Ausführbarkeit wegen für die Praxis nicht gut geeignet.

Das von Mohr empfohlene Verfahren³⁾ mit Ferrosulfat ist wohl einfach, allein nach vergleichenden Untersuchungen verschiedener Forscher⁴⁾ ⁵⁾ ⁶⁾ nicht genügend präcis.

In Anbetracht dieser Umstände machte mich Hr. Prof. v. Than darauf aufmerksam, dass es werthvoll wäre, eine Methode ausfindig zu machen, mit deren Hülfe sich im Wasser gelöster Sauerstoff rasch und pünktlich bestimmen liesse. Mit seiner Unterstützung arbeitete ich zu genanntem Zwecke die unten beschriebene Methode aus, die wesentlich im Folgenden besteht:

Man oxydirt durch den in einer gewogenen Menge Wasser gelösten Sauerstoff überschüssiges Manganhydroxyd in Gegenwart von Alkali zu Manganihydroxyd. Hernach setzt man zur Flüssigkeit Jodkalium und Salzsäure, wobei sich eine dem gelösten Sauerstoff äquivalente Menge Jod ausscheidet. Dieses titirt man mit Natriumthio-sulfat-Lösung, woraus sich die Sauerstoffmenge genau berechnen lässt.

Zur Ausführung wendet man eine ungefähr zweimal normale Manganochlorid-Lösung an (in 100 cem 40 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$). Man achte darauf, dass das Manganochlorid nicht mit Eisen verunreinigt sei. Aus einer angesäuerten Jodkaliumlösung scheidet es höchstens Spuren von Jod aus.

¹⁾ Bunsen, Gasometrische Methoden, II. Aufl., S. 18. Zur Auskochung der im Wasser gelösten Gase construirten auch Reichardt, Jacobsen und Behrens Apparate. Zeitschr. f. analyt. Chem. XI, S. 271 und Journ. f. prakt. Chem. (N. F.) XIX, S. 409.

Compt. rend. 75, 879. Bull. Soc. chim. Par. XIX, 152 und XX, 145.

²⁾ Mohr-Classen, Titirmethode VI. Aufl., S. 255.

⁴⁾ König und Mutschler, diese Berichte X, 2017.

⁵⁾ Tiemann und Preusse, diese Berichte XII, 1768.

⁶⁾ König und Krauch, Zeitschr. f. analyt. Chem. XX, 259—282.

Figura 5. Primera página del trabajo publicado por Lajos Winkler sobre la determinación de oxígeno en agua (L.J. Winkler, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1888, 21(2), 2843-2854).

La importancia del oxígeno para la vida acuática se conoce desde hace mucho tiempo (63). Una desventaja del método es que la valoración final hay que hacerla en el laboratorio, dado el equipo necesario para llevarla a cabo. En consecuencia, en el trabajo de campo, las muestras conteniendo el $MnO(OH)$ tienen que transportarse tan

rápido como sea posible al laboratorio en vasijas cerradas, sin llegar a tardar nunca más de tres horas, para concluir el trabajo (63).

Winkler es famoso también por introducción el uso de la disolución de ácido bórico en el atrape del amonio desprendido en la etapa de destilación del método de

Kjeldahl (64-65), previo a la posterior valoración del borito amónico formado con una disolución patrón de ácido clorhídrico.

Elemér Schulek (1893-1964) fue asistente de Winkler a partir de 1918, y en 1926 becado por la Fundación Rockefeller (6) hace un viaje de estudios por EEUU y algunos países europeos investigando sus industrias farmacéuticas. Llega a la jefatura de la División Química del Instituto Nacional de Salud en 1927, y "Professor" de Química Inorgánica y Analítica en la Universidad de Budapest en 1944. Contribuye a crear sólidas bases para el análisis actualizado de los fármacos.

7. LA QUÍMICA ANALÍTICA DE LOS HALÓGENOS UNA CIENCIA HÚNGARA: EL ÍNDICE DE IODO

La determinación del número de yodo de los ácidos grasos insaturados es similar en muchos aspectos (66-67) a los métodos de bromación. El primer método propuesto fue ideado por Hübl (68-70), y suponía el tratamiento de la muestra disuelta en cloroformo con yodo en presencia de cloruro de mercurio como catalizador, valorándose el exceso de yodo con tiosulfato de sodio. Aunque la velocidad de adición de yodo es mucho más lenta que la de bromo, salvo uno o dos casos aislados, es el reactivo más ampliamente utilizado para llevar a cabo la determinación de la instauración. Los resultados se expresan generalmente como los índices de yodo.

A Winkler se debe el método más general para la determinación del índice de yodo-bromo (4). Debe notarse que la determinación de los índices de bromo fue abordada antes de que el yodo fuera usado para la determinación, pero debido a la aparición de reacciones de sustitución laterales, era muy difícil la obtención de resultados reproducibles. Las condiciones experimentales no fueron cuidadosamente examinadas por lo que se consideró que el método no era muy satisfactorio. El primer método propuesto de determinación para el índice de bromo era gravimétrico. Knop (71-73) propone un método volumétrico, en el que añade una disolución de bromato de potasio patrón a las grasas fundidas, junto con el bromuro de hidrógeno, valorando el exceso de bromo por retroceso con tiosulfato de sodio hasta decoloración de la disolución. Define el índice de bromo como la cantidad de bromato de potasio en cg consumido por 1 g de grasa.

Debido a las determinaciones de ioduro y bromuro, la química analítica de los halógenos ha sido considerada (6) una rama distintiva de la ciencia húngara. Winkler oxida con cloro el ioduro a iodato, eliminándose por ebullición el exceso de cloro, midiéndose la cantidad de iodato (seis veces superior a la de ioduro) por iodometría. El método propuesto es por consiguiente un método de amplificación (74-77). Este principio se utiliza (50) en análisis orgánico, en los métodos microiodométricos de determinación de grupos funcionales metoxilo y etoxilo, midiendo la cantidad de CH_3I o $\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$.

8. COMENTARIOS FINALES

A pesar de situarse en la periferia, las conexiones con

Viena, consecuencia de la pertenencia de Hungría al imperio austro-húngaro y las relaciones internacionales fruto de la movilidad individual y de la importante tarea llevada a cabo reflejada en publicaciones prestigiosas y en la creación de Centros de Investigación evocan una Escuela científica emergente (6, 78), de excelencia, que encuentra eco a nivel internacional. Than se forma con dos de los científicos más destacados de su época, Bunsen y Wurtz y de regreso a Budapest se convierte en un impulsor de la química científica y de la educación farmacéutica en Hungría, objetivos que comparte su discípulo Winkler (4-5). Than propone el bi-iodato potásico para la estandarización de tiosulfato de sodio, problema complejo en aquella época, dada la dificultad que se tenía para obtener yodo de una elevada pureza. Winkler, farmacéutico, desarrolla un método iodométrico para la determinación del oxígeno disuelto en aguas, de uso (63) hoy día. El uso del dicromato de potasio por Zulkovsky (4-5, 36) despeja el camino para las aplicaciones analíticas de las oxidaciones con dicromato en iodometría. Las determinaciones de ioduro, bromuro, índice de yodo y otras, la química analítica de los halógenos es susceptible de considerarse como una rama distintiva de la ciencia húngara. El viaje de estudios de Schulek, discípulo de Winkler, becado por la Fundación Rockefeller abre las puertas al desarrollo del análisis y de la industria farmacéutica en Hungría.

9. REFERENCIAS

1. Sáez Plaza P. De los Alcalis del Comercio a los Métodos Iodométricos: Contribuciones Farmacéuticas al Desarrollo del Análisis Volumétrico, Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla,
2. Szabadváry F. Reflections on the history of analytical chemistry in Hungary. Ion-Selective Electrodes 1989; 671-675.
3. Szabadváry F. Geschichte der analytischen Chemie in Ungarn. Talanta 1963; 10 (3): 433-438.
4. Szabadváry F. History of Analytical Chemistry, Pergamon Press, Oxford, 1966; pp. 182-184, 249, 252-255; History of Analytical Chemistry; Gordon and Breach: Yverdon, Switzerland, 1992.
5. Svehla G. (Ed.) Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, Vol X, Elsevier: Amsterdam, 1980; pp. 159-160, 191-193.
6. Simon AL. Made in Hungary: Hungarian contributions to universal culture, Corel Ventura Publishers: Safety Harbor, FL, 1998; p. 222.
7. Szabadváry F. Than, Károly, Budapest, 1971.
8. Szabadváry F. Than, Károly. En Dictionary of Scientific Biography, Vol. 13, Charles Scribner's Sons: New York, 1976; pp. 298-299.
9. Kauffman GB. Karoly Than (1834-1908), founder of modern Hungarian chemistry. J Chem Educ 1989; 66 (3): 213-216.
10. Carl von Than; https://en.wikipedia.org/wiki/Carl_von_Than

11. Glässer E. Károly Than, the founding father of the Hungarian scientific chemistry and pharmacist education, 41st International Congress for the History of Pharmacy, Paris 10-14 of September 2013; <http://www.shp-asso.org/medias/docs/1-L.077>
12. Beck MT, Kauffman GB. COS and C₃S₂: the discovery and chemistry of two important inorganic sulfur compounds. *Polyhedron* 1985; 4 (5): 775-781.
13. Palló, G. Roles and Goals of Chemical Textbooks in the Periferia. En Lundgren, A.; Bensaude-Vincent, B. (Eds.) *Communicating Chemistry Textbooks and Their Audiences 1789-1939*, Watson Publishing International: Canton, MA, 2000; pp. 367-396.
14. Nadasi Andras, Muzeális taneszközök a vegytan szemléltetéséhez és tanulásához II; www.tanszertar.hu/eken/2007-02/na-0702.htm
15. Than K. Magyar Gyógyszerkönyv (Pharmacopoea Hungarica), Budapest 1871.
16. Than K. Független a magyar gyógyszerkönyvhöz. Additamentum ad pharmacopoeam hungaricam, Budapest, 1883.
17. Than K. A volumetrikus normáloldatok készítéséről. [I.]. *Mathematikai és Természettudományi Értesítő* (1887 október-1888. június) 1887-1888; 6: 117-124.
18. Than, K. A volumetrikus normáloldatok készítéséről. (Második értekezés). *Mathematikai és Természettudományi Értesítő* (1888/89) 1888-1889; 7: 123-130.
19. Than K. Über die Bereitung der volumetrischen Normallösungen. *Mathematische und naturwissenschaftliche Berichte aus Ungarn* (Juni 1887-Juni 1888) 1889; 6: 127-135.
20. Than K. Über die Darstellung der volumetrischen Normallösungen. *Mathematische und naturwissenschaftliche Berichte aus Ungarn* (Juni 1888- October 1889) 1890; 7: 295-303.
21. Szökefalvi-Nagy Z, Szabadvary F. Ein Vorschlag zur Darstellung der Analyseergebnisse in Ionenform schon von der Ausarbeitung der Ionentheorie. *Talanta* 1966; 13 (3): 503-506.
22. Ostwald W. *Die Wissenschaftlichen Grundlagen der analytischen Chemie*, Zweite vermehrte Auflage, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1897.
23. Than K. *A kísérleti chemia elemei*, vols 1-3, Budapest, 1897, 1898, 1906.
24. Szabadvary F. Szökefalvi-Nagy, Z. *A kemia története Magyarországon* (The History of Chemistry in Hungary), Akadémiai Kiadó: Budapest, 1972.
25. Ostwald W. *Lehrbuch der allgemeinen Chemie*, In Zwei bänden, Verlag von Wilhelm Engelmann: Leipzig, 1887.
26. Than K. *A qualitativ kémiai analysis elemei* (Elementos de análisis químico cualitativo), Budapest, 1895.
27. Than K. *Feladatok a kémiai gyakorlatokhoz kezdők részére* (Ejercicios de prácticas químicas para principiantes), Budapest, 1898.
28. Miháli B, István G, Sándor P, Ágnes BS. Than Károly (1834-1908) kémikus, gyógyszervegyész, egyetemi tanár, akadémikus é letmű-bibliográfiája, Scientific Publications of the Hungarian Scientific History Institute 8, Budapest, 2014; <http://real.mtak.hu/id/eprint/14466>
29. Than K. *Térfogatos elemzési jegyzetek*. A Királyi Magyar Természettudományi Társulat Közlönye 1860; 1: 67-75.
30. Riegler E. Zur Titerstellung der Thiosulfatlösung mittelst Jodsäure. *Z Anal Chem* 1896; 35: 308.
31. Gröger M. Jodometrische Bestimmung der Alkalien und Säuren. *Z Angew Chem* 1890; 353-356.
32. Laitinen HA, Ewing GW. *A History of Analytical Chemistry*, Division of Analytical Chemistry of the American Chemical Society: Washington DC, 1977.
33. Szabadvary F, Chalmers RA. Mohr, Carl Friedrich and analytical chemistry in Germany. *Talanta* 1979; 26 (8): 609-617.
34. Kjeldahl J. Nogle Bemaerkninger om den jodometriske Syretitrering. *Medd. Lab. Carlsberg* 1888; 2 (5): 323-329; Quelques Remarques sur le Dosage Iodometrique des Acides (resumen en francés: Résumé du CR Trav. Lab. Carlsberg; sección paginada separadamente); 2 (5): 193-196.
35. Sáez-Plaza P, Michalowski T, Navas MJ, Asuero AG, Wybraniec S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Crit Rev Anal Chem* 2013; 43 (4): 178-223.
36. Zulkowsky K. Ueber eine jodometrische Bestimmung der Chromsäure. *J Prakt Chem* 1868; 103 (1): 351-363.
37. Reischauer CA. Ueber die Relation zwischen Zucker, Dextrin und Alkohol in Biere. *Dinglers Polytech J* 1862; 451-462.
38. Rao GC. Potassium dichromate as an oxidimetric reagent. *Talanta* 1966; 13: 1473-1495.
39. Janos H. A pesti tudományegyetem néhány kiváló gyógyszerész- tanítványa és-professzora. *Comm Hist Artis Med* 1971; 57-59: 303-310.
40. Szabadvary F, Vamos E. Lectures in chemistry at the medical faculty of the University of Nagyszombat (en Húngaro). *Or Vostort Kozl* 1994; 40 (3-4): 45-54.
41. Majoros K, Mazak K. The role of pharmacists, Members of the Hungarian Academy of Sciences, in the History of Chemistry [Akadémikus gyógyszerészeink szevepe a Kémia fejlődéstörténetében]. *Acta Pharm Hungarica* 2010; 80: 81-92.
42. Vamos E. Three generations of natural scientists in Hungary, 1848-1918. *The Global and the Local, The history of Science and the cultural Integration of Europe*. Proceedings of the 2nd ICESH; M. Kokowski (Ed.); Chapter 10/Symposium R-2, Achievements of Central Europe in Science, in the light of historical studies; Cracow, Poland, September 6-9, 2006; pp. 274-288.
43. Lajos H. Levél a szerkesztőséghez. Patikus professor Winkler Lajos (1836-1939). *Gyógyszerészet* 1989; 33: 102-103.

44. Bizottság S. Winkler Lajos, Gyógyszeré 1963 (marcius), 81-83.
45. Winkler Lajos irodalmi munkásságának bibliográfiája. Gyógyszeré 1963; (marcius), 85-89.
46. Bierbrauer-Wurtz I de G. Winkler, Lajos Wilhelm. In Dictionary of Scientific Biography, Vol. 14, Charles Scribner's Sons : New York, 1976; pp. 447-448.
47. Szebellédy L. Winkler Lajos dr. emlékezete, Budapest 1940; pp. 17-26.
48. László M. Winkler Lajos (Arad, 1863 máj 21-Budapest 1939 ápr 14); <http://tudosnapar.kfki.hu/w/i/winkler/winklerpant.htm>
49. Szabadváry F. Winkler Lajos, Akadémiai kiadó, Bp. 1975.
50. Schulek E. L.W. Winkler (1863-1939). Talanta 1963; 10 (5): 423-428.
51. Lajos Winkler; https://en.wikipedia.org/wiki/Lajos_Winkler
52. Winkler LW. Ausgewählte Untersuchungsverfahren Für Das Chemische Laboratorium, F. Enke: Stuttgart, 1931-1936.
53. McCromick PG. The determination of dissolved oxygen by the Winkler method. A student laboratory experiment. J Chem Educ 1972; 49 (12): 839-841.
54. A víz oxigéntartalmának meghatározása; http://www.csepegikiki.hu/feltoltesek/hirek/379/.../Winkler_Lajos.ppt
55. Avizben oldott oxygen meghatározása; <http://www.fizikashow.hu/eloadas/3/Eload/Fizmunkak/Oxigen.pps>
56. Winkler LW. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. Ber Dtsch Chem Ges 1888; 21 (2): 2843-2854.
57. Jones M, Mullen MW. Some aspects of the Winkler determination of oxygen in water. Talanta 1973; 20: 327-329.
58. Lindstrom RE, Patel SN, Wilkinson PK. The determination of oxygen in aqueous solution: a review of methods. J Parenteral Drug Assoc 1980; 34: 5-13.
59. Wong GTF. Removal of nitrite interference in the Winkler determination of dissolved oxygen in sea water. Mar Chem 2012; 130-131: 28-32.
60. Wong GTF, Wu Y-C, Li K-Y. Winkler's method overestimates dissolved oxygen in seawater: hydrogen peroxide interference and its implications. Mar Chem 2010; 122: 83-90.
61. Wong GTF, Li K-Y. Winkler's method overestimates dissolved oxygen in seawater: iodate interference and its oceanographic implications. Mar Chem 2009; 115: 86-91.
62. HP Hydrology Project, Training module # WQ-11. The chemistry of dissolved oxygen measurements, New Delhi, May 1999.
63. Entz B. The dissolved oxygen determination method is 120 years old. In memoriam Lajos Winkler (1863-1939) and Rezco Maucha (1882-1964). Acta Zoologica Academia Scientiarum Hungarica 2008, 53 (suppl. 1), 7-11.
64. Winkler JW. Beitrag zur titrimetrischen Bestimmung des ammoniaks. Z Angew Chem 1913; 26 (31): 231-232.
65. Martin J, Fernandez Sarria L, Asuero AG. The Kjeldahl Titrimetric Finish: On the Ammonia Trapping in Boric Acid, En "Advances Techniques in Titration", V.D. Hoang (Ed.), Chap. 2, InTech, Rijeka (Croacia), 2017; pp. 23-58.
66. Sáez-Plaza P, Martin J, Asuero AG., Dichromate oxidation of ethanol and phenol bromination: a tale of two reactions. Ann Real Acad Nat Farm, en prensa.
67. Michalowski T, Asuero AG, Pnikvar-Svet M, Michalowska-Kaczmarczyk AM, Wybramic S. Some examples of back redox titrations. Chem Educ 2014; 19: 217-222.
68. Hübl A. Eine allgemein anwendbare Methode zur Untersuchung der Fette. Dinglers Polytech J 1884; 281-295.
69. Deelstra H, Burns T, Walker MJ. The adulteration of food, lessons from the past, with reference to butter, margarine and fraud. Eur Food Res Technol 2014; 239 (5): 725-774.
70. Knothe G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? J Am Oil Chemist's Soc 2002; 79 (9): 847-854.
71. Knop W. Ueber Anwendung des Broms zum Bromiren organischer Substanzen nach quantitative bestimmaren Verhältnissen, und eine maassanalytische Poüfungsmethode für Fette und flüchtige Oele. Chemisch-pharmaceutisches Central-Blatt 1854; 25: 321-332.
72. Knop W. Ueber einige bromirte flüchtige Oele und Fette. Chemisch-pharmaceutisches Central-Blatt 1854; 25: 498-501.
73. Knop W. Weitere Mittheilungen über maassanalyt-Untersuchung mittels Brom, in specieller Anwendung auf Fette und flüchtige Oele. . Chemisch-pharmaceutisches Central-Blatt 1854; 25: 403-414.
74. Belcher R. Amplification reactions. Talanta 1968; 15 (4): 357-366.
75. Belcher R. Amplification reactions. Talanta 1977; 24 (8): 533-534.
76. Belcher R, Stephen WI. Recommendations on use of the term amplification reactions. Pure Appl Chem 1982; 54 (12): 2553-2556.
77. Blaedel WJ, Boguslaski RC. Chemical amplification in analysis: a Review. Anal Chem 1978; 50 (8): 1026-1032.
78. A kémiai intézetek egyetemünkön; www.chem.elte.hu/system/.../Orban_Miklos_Than%20Károly.ppt



Analysis of on line marketing of counterfeit medicines

Title in Spanish: *Análisis del comercio on line de medicamentos falsificados*

Trinidad M.^a Raya Díaz^{1*}, M.^a Encarna Raya Díaz¹, Dolores Tous Zamora², Guillermo Bermúdez González²

¹Farmacéutica comunitaria. ²Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Universidad de Málaga.

ABSTRACT: Technological changes, because of their disruptive and dynamic nature, have implied a social change in the way to acquire any consumer product. Medicines are not excluded from this tendency, and in recent years a significant increase has been recorded in their acquisition through unofficial channels such as the internet. These new forms of marketing are closely linked, however, to the counterfeiting of drugs. Counterfeit drugs are truly nasty products which can cause serious problems in those taking them. This fraudulent and legally largely unpunished business, however, generates a large income for the counterfeit drugs networks. This is why this market is constantly increasing, as are the perfection and variety of the counterfeit drugs marketed. In the following article we shall make a descriptive analysis, both qualitative websites which characteristically deal in counterfeit medicines. We shall also analyse the legal and non-legal rules (both national and international), as also the strategic plans (both national and international), which have been established by medical authorities and individuals to oppose the use of spurious medication and to eradicate the spread of the distribution channels and, thereby, to safeguard the health of patients by preventing them from taking counterfeit medicines.

RESUMEN: Los cambios tecnológicos por su naturaleza disruptiva y dinámica han supuesto socialmente un cambio en el modo de adquirir cualquier bien de consumo. Los medicamentos no están ajenos a esta tendencia y en los últimos años se ha registrado un aumento significativo de la adquisición de estos a través de canales no oficiales, como internet. Sin embargo, estas nuevas formas de comercialización están íntimamente relacionadas con la falsificación de los medicamentos. Los medicamentos falsificados son realmente productos nocivos que pueden ocasionar graves problemas de salud a sus consumidores. Sin embargo, esta comercialización, fraudulenta y legalmente poco castigada, reporta un gran beneficio económico a las redes distribuidoras. Por ello, la incidencia de este mercado es cada vez mayor, así como la perfección y variedad de los medicamentos falsificados. En el siguiente artículo realizaremos un análisis descriptivo cualitativo y cuantitativo de un muestreo aleatorio de páginas web, que por sus características comercializan con falsificaciones de medicamentos. Asimismo, analizaremos las normas jurídicas y no jurídicas de ámbito europeo y nacional y los planes estratégicos nacionales e internacionales que se han establecido para luchar contra el fraude de los medicamentos espurios, utilizados por autoridades y profesionales de la salud para intentar erradicar la proliferación de estos canales de distribución y proteger la salud de los pacientes, impidiéndoles consumir medicamentos falsificados.

*Corresponding Author: trinidadmariaraya@jafarco.com

Received: June 8, 2017 Accepted: October 18, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 3 (2017), pp. 343-355

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos han constituido y constituyen un pilar fundamental para la evolución de la humanidad. Gracias a ellos se ha podido luchar eficazmente contra la enfermedad. Por lo que han contribuido a la mejora de la esperanza y al aumento de la calidad de vida.

Los medicamentos ayudan a prevenir, curar o aliviar enfermedades y sus secuelas, pero no son productos inocuos. Tienen fundamentalmente una función curativa, pero no están carentes de efectos negativos sobre la salud del paciente. Ya Plinio el Viejo (23-79 d. C.), con su aforismo “Medicamenta non mella”, aludía a que los medicamentos no son miel o golosina. De esta manera,

advertía del riesgo intrínseco de su banal o mal uso.

El medicamento no es un bien de consumo sujeto a las leyes de mercado oferta-demanda, es un bien sanitario que se caracteriza por una intervención y control exhaustivo por parte de las autoridades sanitarias durante todas las etapas de su desarrollo. Este control se hace también extensivo a todas las personas naturales y jurídicas vinculadas a su elaboración, distribución y dispensación (1).

El acceso de la población a los medicamentos debe de reunir una serie de requisitos: el paciente debe acceder al medicamento en el momento oportuno y el medicamento ha de ser de calidad, suministrado en las cantidades

adecuadas para responder al tratamiento y debe de ser efectivo para el uso al que se le estima (2).

El Real Decreto 1/2015 ha definido el medicamento como sustancia o combinaciones de estas que, en base a sus propiedades para diagnóstico, prevención, tratamiento de la enfermedad y mediante una acción farmacológica, puedan restaurar las funciones fisiológicas saludables del individuo. Además, les exige a los medicamentos alcanzar unos requisitos para que ofrezcan garantías de calidad, seguridad y eficacia, estar correctamente identificados y suministrar información clara y precisa al paciente (3).

La anterior definición de lo que es un medicamento nos deja un claro concepto de la función de todo medicamento y de las garantías que debe cumplir para su comercialización. Esto nos lleva a intuir, sin temor a equivocarnos, lo que es un medicamento falsificado.

La definición más aceptada de medicamentos falsificados es la que ha enunciado el *Grupo de Trabajo Internacional Contra la Falsificación de Medicamentos (IMPACT)*. Según esta definición, un medicamento falsificado es aquel en el que “se da una representación falsa, y de forma fraudulenta y deliberada, de su identidad (incluyendo declaraciones engañosas con respecto al nombre, la composición, la dosis farmacéutica u otros elementos) y/o procedencia (incluyendo declaraciones engañosas respecto al fabricante, el país de fabricación, el país de origen, el titular de la licencia de comercialización o las vías de distribución (4). Por lo que esta enunciación va dirigida a salvaguardar las garantías de calidad del medicamento.

La mayoría de los bienes de consumo poseen, en la actualidad, su versión pirata, por lo que los medicamentos no iban a ser una excepción. La falsificación es una lacra que también ha llegado al campo de la salud.

Todos los años mueren miles de personas por el uso de este tipo de fármacos. Datos de la *Organización Mundial de la Salud (OMS)* alertan que se ha estimado que más del 50 % de medicamentos, adquiridos a través de sitios web sin domicilio social declarado, son productos falsificados y el 1 % de los medicamentos vendidos en mercados desarrollados también son falsificados (5).

En los últimos años, coincidiendo con el uso generalizado del internet, se ha registrado un aumento en las actividades de comercialización de medicamentos falsificados, constituyendo una amenaza global que afecta a todos los países. En un principio, esta actividad estaba vinculada a los países en vías de desarrollo, donde por sus características legales y socioeconómicas era más difícil el acceso a los servicios sanitarios y a los medicamentos. Sin embargo, afecta también a los países desarrollados en los que, no sólo nos encontramos medicamentos espurios cuando se han adquirido a través de internet, sino que incluso se han encontrado en la cadena legal de distribución de medicamentos (6).

Como ejemplos, en Singapur, en 2008, se detectó que un medicamento indicado para la disfunción sexual estaba adulterado con un fármaco antidiabético lo que produjo

lesiones cerebrales e, incluso, el fallecimiento de cuatro personas. En 2012, en Estados Unidos 19 pacientes con cáncer fueron tratados con un medicamento que carecía del principio activo (7).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los últimos años del siglo XX se han caracterizado por el rápido desarrollo de las tecnologías de la información, constituyendo internet el ejemplo más importante. Internet es una red abierta, interactiva y digital, que permite compartir información y servicios en todo el mundo. Este fenómeno ha tenido especial repercusión en las actividades económicas, reforzando los procesos de globalización y dando lugar a un cambio de paradigma en las transacciones financieras y comerciales (8).

Internet es un sistema que ha permitido a las empresas ofrecer sus productos o servicios al mercado global, sin límites geográficos y de una manera continuada 24 horas los 365 días del año, lo que le confiere una total flexibilidad de horarios. Además, admite la actualización inmediata de los contenidos de las páginas web, lo que aporta una mayor rapidez de respuesta a la demanda del mercado. Y facilita entre el vendedor y el cliente una comunicación ágil y fluida, que puede dar lugar a una relación a largo plazo entre las partes (9).

Ante las anteriores alabanzas del comercio digital, el mercado del medicamento no ha sido ajeno a esta revolución que ha supuesto el internet. En España, con el objeto de establecer una protección pública y reducir los riesgos, el Real Decreto 870/2013 fue aprobado para regular la venta on line de medicamentos sin receta (10), y el Real Decreto Legislativo 1/ 2015 de 24 de julio, que aprueba el texto refundido de la ley de garantías y uso racional de medicamentos y productos sanitarios y que abarca la mayor parte de la regulación completa sobre los medicamentos no sujetos a prescripción médica para su dispensación.

Pero paralelamente ha existido desde el inicio de internet un mercado paralelo e ilegal de venta de medicamentos falsificados y no autorizados. Es un mercado donde podemos encontrar distintas formas de organización delictivas que van desde pequeños grupos a grandes y sofisticados que trabajan de manera internacional. Todos ellos se caracterizan porque se mueven con facilidad y aprovechan la posibilidad que les brinda la tecnología de establecer rápidamente nuevas webs cuando estas son interceptadas por las autoridades. Además, el mundo digital les permite contar con otra ventaja más: el alto nivel de anonimato (11).

Este negocio ilegal de medicamentos es muy lucrativo y se encuentra poco penado respecto a otros delitos que atentan contra la Salud Pública, como el narcotráfico. Internet proporciona a estas redes criminales un gran reclamo publicitario y prácticamente una total impunidad. Por ello, y ante la magnitud del problema y ante la insuficiencia de las sanciones administrativas y penales, se ha procedido a revisar el régimen jurídico de estos delitos tipificados contra la Salud Pública adaptándolo a las

exigencias europeas. Así queda recogido en la Ley Orgánica 10/1995 de 23 de noviembre, en su última actualización de 28 abril de 2015 y en su Capítulo III “*De los Delitos contra la Salud Pública*”, arts. 359 a 378 (12). Dando cumplimiento al “Convenio del Consejo de Europa sobre la falsificación de productos médicos y productos sanitarios e infracciones similares que suponen una amenaza para la salud pública” (Moscú, 28 de octubre de 2011, ratificado por España en 2013, también llamado Convenio Medicrime (13).

El objetivo de esta investigación ha sido el estudio y posterior análisis de páginas web, que ofertan la compra de medicamentos on line. A partir del estudio realizado a las páginas web que ofertan medicamentos se pudieron establecer una lista de atributos, que identifican la imagen corporativa de las páginas web de venta de medicamentos. Se realizó una búsqueda en la que se agruparon criterios para encontrar y especificar atributos comunes en todas ellas, para que de esta manera se pueda unificar el estudio marcando sus directrices. Tendríamos así un método estructurado para el análisis de la imagen corporativa de estas webs (14).

Posteriormente, hemos incorporado los resultados a un instrumento normalizado de medida, para valorar las respuestas que para cada particularidad seleccionada hemos obtenido en las webs. Obteniendo como resultado “un perfil de imagen”. Este tipo de modelo ofrece muchas ventajas, entre otras las que facilitan las comparaciones entre webs, de esta manera concluiríamos nuestro estudio.

Las hipótesis que hemos buscado a contrastar son las siguientes:

-Hipótesis 1: Los atributos percibidos por los públicos son similares entre las webs.

-Hipótesis 2: Los atributos estudiados en la mente de los públicos se encuentran agrupados e identificados en tres dimensiones.

Para el paciente aquejado de una determinada patología poder adquirir un medicamento, a través de internet, que le pueda resolver su problema de salud supone una decisión importante, por lo que es fundamental estudiar la percepción que tienen del producto (15). Más aún, ante la perspectiva de la mejoría de la enfermedad, las emociones tienen un rol muy importante en la apreciación de valor para la mayoría de los pacientes-consumidores. En estos casos, las emociones influyen de una manera más profunda en la disposición de compra que cuando la decisión de adquirir un artículo es tomada de una manera más racional (16). Por tanto, podemos afirmar que el comportamiento final del consumidor está influenciado por la interrelación de múltiples variables, lo que lo convierte en acto muy complejo (17).

Inspirándonos en el informe “Traffic on line”, realizado por HAVAS en 2010 (18), se ha procedido a realizar el estudio empírico de páginas web, para ello se hizo una búsqueda a través del buscador Google.es, poseedor prácticamente del monopolio de las búsquedas en internet, atendiendo a las siguientes consultas:

- Comprar medicamentos.
- Comprar Viagra (Lab Pfizer).
- Comprar Cialis (Lab Lilly).
- Comprar Levitra (Lab Bayer).

Se han elegido los anteriores medicamentos para el estudio por varios motivos:

-Son medicamentos de obligatoria prescripción médica y para su dispensación es requisito imprescindible la receta médica, por tanto en España el Real Decreto 870/2013 no permite su venta on line.

-Estos fármacos, cuya indicación terapéutica es la disfunción eréctil, son muy demandados través de internet. El comercio en red da la posibilidad de obtenerlos fácil y cómodamente, sin necesidad de receta médica y con la percepción de un precio de compra más económico que el que se dispensa en las farmacias. Además, proporciona anonimato ante esta enfermedad considerada vergonzante o tabú.

Según un estudio de mercado realizado por las autoridades sanitarias, el 65% de los fármacos para la disfunción eréctil o problemas de erección que se compran por Internet son falsos (19) y son los medicamentos falsificados más incautados por las aduanas de todo el mundo (20).

Las categorías o atributos que caracterizan a las webs están perfectamente identificadas y las vamos a clasificar en:

A- Características del entorno web.

1. Diseño.
2. Contenidos.
3. Tipo de establecimiento.
4. País origen.
5. Formas de contacto.
6. Testimonios.
7. Registro web.
8. Envíos.
9. Protección de datos.
10. Advertencias legales.

B- Características relacionadas con los precios y el surtido.

11. Surtido de productos.
12. Política de precios.
13. Promociones y regalo.
14. Formas de pago.

C- Características de índole sanitaria.

15. Receta médica.
16. Asesoramiento médico o farmacéutico.
17. Formulario médico o receta vinculado a la compra.
18. Información sobre el medicamento.

Para analizar los anteriores elementos del comercio electrónico de medicamentos falsificados se ha hecho uso del siguiente estudio, cuya ficha técnica sería:

- Tipo de estudio: **Cualitativo y Cuantitativo.**
- Herramientas informáticas: **Programa Excel y SPSS**

v. 24.0.

- Técnica estudio: **Revisión páginas webs.**
- Método muestreo: **Aleatoria.**
- Tamaño muestra: **200 páginas web.**
- Fecha estudio: **Octubre 2016 a Marzo 2017.**

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño

Todas las páginas web tienen un diseño que se caracteriza por hacerlas muy intuitivas, lo que hace fácil la navegación ayudando a los consumidores rápidamente a realizar su compra y evitando el abandono del usuario por no lograr su objetivo.

Los *sites web* estudiados presentan un diseño muy atractivo y profesional que genera confianza y seriedad. En la mayoría, en sus páginas de inicio nos encontramos con fotografías de personal sanitario: médicos, enfermeras... que aportan credibilidad en el campo de la salud. Es un elemento de *marketing* para intentar despejar las dudas al usuario, en cuanto al contenido sanitario de las páginas. Esta imagen genera credibilidad y garantía de la calidad y eficacia de sus productos. Sin embargo, en la realidad y según el estudio europeo “Cracking Counterfeith Europe” (2009), realizado por los laboratorios Pfizer sobre medicamentos ilegales e internet, nos encontramos que los laboratorios de elaboración son pisos, naves, garajes..., en malas condiciones y sin la higiene adecuada (21). Y como principio activo de su composición nos encontramos desde sustancias inocuas: almidón maíz, patata... hasta productos tóxicos como pinturas (22).

Otra característica común a todas ellas es que el *index* tiene una carga rápida, es decir presentan una buena velocidad de web.

3.2. Contenidos

Están muy bien estructurados de forma clara y objetiva. La forma de presentarse es similar a todas ellas. Habitualmente, como las páginas tienen una proyección de venta a distintos países, te permiten elegir tanto la moneda en la que vas a realizar la compra, como el idioma de acceso a la página. Ahora bien, las traducciones no están bien hechas. Hay un mal uso del vocabulario y aparecen expresiones gramaticalmente incorrectas, que puede dar lugar a equívocos. En ocasiones encontramos que se dice en la misma web lo mismo y su contrario.

La información es mostrada en distintas pestañas:

“Sobre nosotros”: es la presentación en la que, en muchos casos, advierten que son fiables y legales, con productos de garantía y alta calidad a bajos precios, ofertando una compra confidencial con un pago seguro y una entrega rápida; “Preguntas más frecuentes” es un manual de manejo y servicios ofertados; “Vademécum de productos”; “Testimonios”; “Estado del pedido”.

Es habitual que todas las páginas presenten enlaces en las redes sociales: Facebook, Twitter...

3.3. Tipo de establecimiento

La mayoría de los *sites* localizados se autodefinen como lugares relacionados con la salud. En algunos casos hay una confusión de conceptos entre farmacia y clínica. Se declaran como farmacias *on line* el 80 %, y el 15 % se denominan clínicas. Solo un 5 % no especifican lo que son, por lo que los clasificamos como comercio *on line* (Figura 1).

Todas hacen referencia a su profesionalidad y seriedad de servicio. En muchas de ellas, advierten a los clientes sobre la existencia de páginas de venta de medicamentos falsificados, haciéndose ellas garantes de ofrecer medicamentos seguros y eficaces.

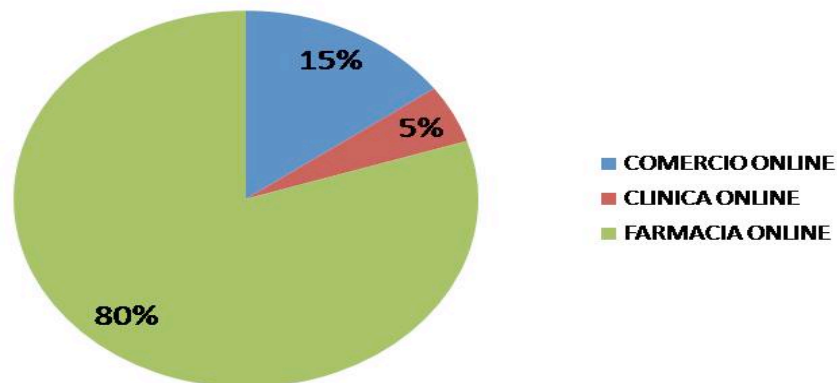


Figura 1. Tipo de establecimiento: Farmacia online (representado en verde), Comercio online (representado en azul), Clínica online (representado en rojo).

3.4. País de origen

Más del 80 % de las páginas no identifican el país desde el que operan, el 20 % sí lo hacen. Entre estos

encontramos Canadá, India, Chipre y España (Figura 2).

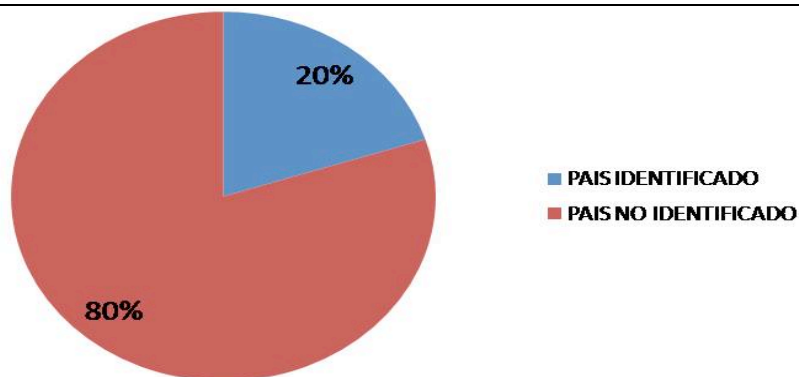


Figura 2. País de origen: País no identificado (representado en rojo), País identificado (representado en azul).

3.5. Formas de contacto con web

El contacto entre la página web y el usuario se realiza en el 65 % de las páginas por dos vías: mail y teléfono. Con un chat de comunicación al servicio del cliente 24 horas día. En el caso de que las páginas manifiestan que

son españolas el prefijo y el número de contacto está de acuerdo con los parámetros del Estado Español. Sólo el 35 % tiene como único mecanismo de comunicación el correo electrónico (Figura 3).

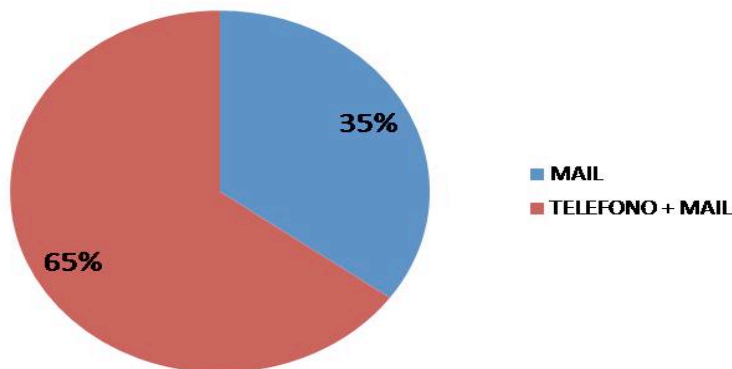


Figura 3. Formas de contacto con web: Teléfono + mail (representado en rojo), Mail (representado en azul).

3.6. Testimonios

En el 70 % de las webs aparecen testimonios de usuarios (Figura 4).

Todos ellos muy positivos, por lo que son utilizados, para captar nuevos consumidores. Estos testimonios dan fe de las bondades de sus medicamentos, del buen servicio y

de las garantías de envío..., son meros reclamos publicitarios, que incitan al autoconsumo de fármacos.

Haciendo una lectura de los mismos se observa que el estilo utilizado es idéntico para todos ellos y que en muchos casos los testimonios se van repitiendo entre las distintas webs.

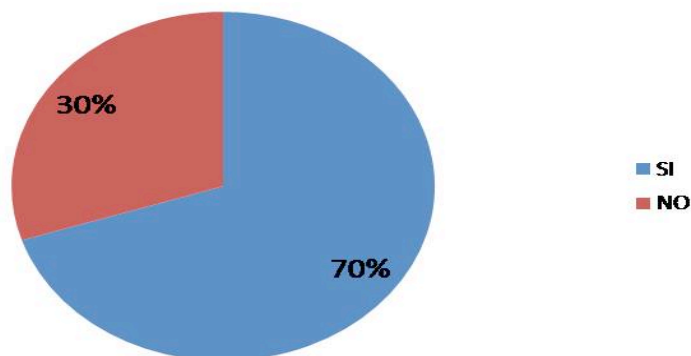


Figura 4. Testimonios: Sí Testimonios (representado en azul), No Testimonios (representado en rojo).

3.7. Registro web

El 55 % de las páginas exigen para acceder al proceso de compra tener que registrarse en ellas. Crear una cuenta

es requisito para comprar, ver el estado de tus pedidos y tener acceso a información adicional de sus productos, en forma de boletín informativo de la página (Figura 5).

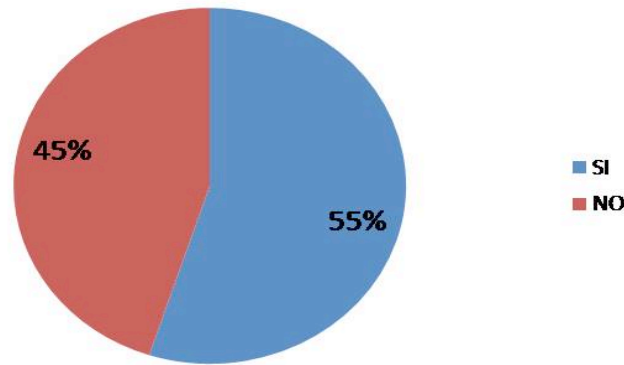


Figura 5. Registro web: Sí Registro (representado en azul), No Registro (representado en rojo).

3.8. Envíos

En el 65 % de las páginas el cliente puede optar a recibir el envío por correo, normalmente aéreo, o por paquetería, agencia de transporte. Los costes y periodos de entrega difieren entre webs. En un 35 % de páginas el envío de la mercancía es únicamente por correo (Figura 6). Todas ofrecen al cliente la posibilidad de hacer un rastreo o seguimiento del pedido.

Los envíos se realizan por medio de pequeños paquetes para que no despierten sospechas en las aduanas a cuyo control están sometidos. A veces, cuando el volumen de pedido es muy grande se fraccionan en distintos embalajes, para pasar más desapercibidos. Advierten que los envoltorios son muy discretos y no hacen referencia exteriormente a su contenido, lo que guardaría la confidencialidad del envío.

En cuanto al destino de envío el 5 % de las páginas no especifica a qué países hacen el envío, el 55 % de webs sí lo hacen a todo el mundo y el 40 % restante son selectivos a los destinos con los que trabajan, especialmente indican que no trabajan con Estados Unidos. Ninguna página manifiesta impedimentos para enviar sus productos a España (Figura 7).

Respecto a la garantía de recibir el envío en el 80 % de las webs sí la hay, bien porque el producto no haya llegado a su destino o porque haya llegado deteriorado. En todos los casos se repone el producto o se devuelve al consumidor su dinero. El 15 % de ellas no garantiza el envío y 5 % no lo especifica (Figura 8).

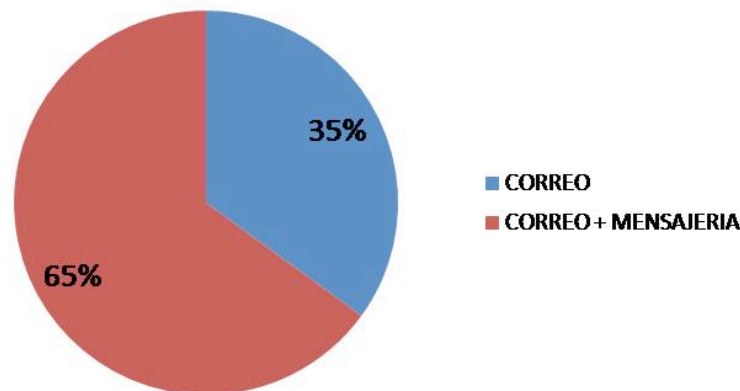


Figura 6. Formas de envío: Correo y Mensajería (representado en rojo), Correo (representado en azul).

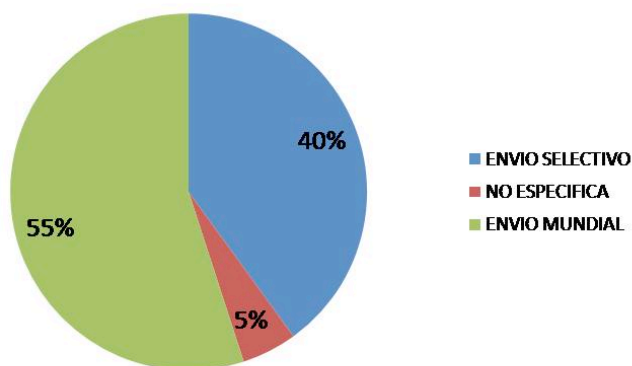


Figura 7. Destino de envío: Envío mundial (representado en verde), Envío selectivo destino (representado en azul), No especifica destino de envío (representado en rojo).

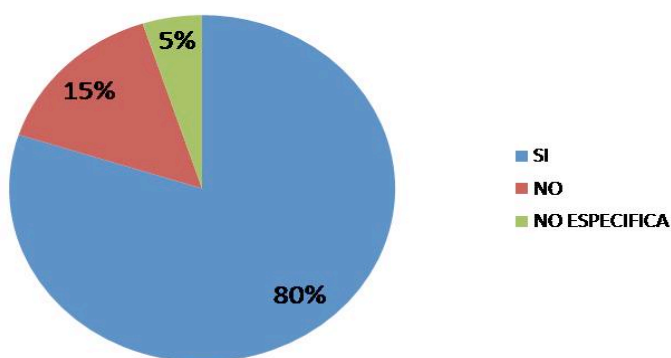


Figura 8. Garantía de envío: Sí (representado en azul), No (representado en rojo), No especifica (representado en verde).

3.9. Protección datos

EL 65 % sí hacen referencia a la protección de datos,

pero sin especificar ninguna ley a la que se acoja esta protección de datos (Figura 9).

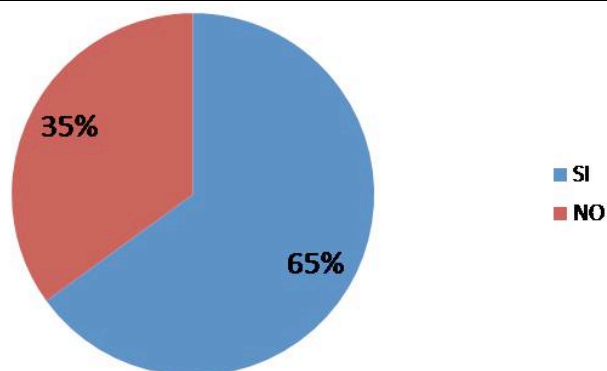


Figura 9. Protección de datos: Sí (representado en azul), No (representado en rojo).

3.10. Advertencias legales

En el 90 % de los casos no hay advertencias legales. Delegan la responsabilidad del acto de compra en el propio

cliente. En el 10 % restante en el que sí hay referencias a las advertencias legales estas se mencionan, pero son muy inespecíficas.

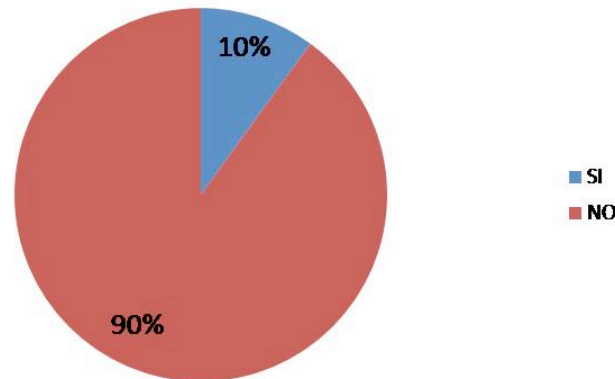


Figura 10. Advertencias legales: No (representado en rojo), Sí (representado en azul).

3.11. Surtido de productos y política de precios

Entre las páginas web podemos hacer dos claras diferenciaciones. Aquellas que ofertan todo tipo de medicamentos, a las que podemos llamar “generales”, porque el vademécum de productos farmacéuticos es muy amplio y representan el 55 %. Son verdaderas farmacias, en las que nos encontramos productos de prescripción muy conocidos y que abarcarían el tratamiento de mayoría de patologías. Estas presentan una profundidad de artículos entre los 400-600, con especial atención a los medicamentos que tratan la disfunción eréctil.

Ofertan todo tipo de medicamentos, desde especialidades éticas a genéricos, aunque no identifican bien si lo que estas comprando es marca o genérico. Encontramos “medicamentos innovadores” con presentaciones, formas farmacéuticas muy atractivas y dosificaciones superiores a las autorizadas e inexistentes en el canal legal farmacéutico. Se comercializan también fármacos procedentes de otros países, por ejemplo, Kamarga, denominación del sildenafilo en la India, estos no están autorizados en España, por lo que son ilegales.

Estas páginas, para facilitar el manejo del usuario,

utilizan una doble o triple clasificación. En la doble se clasifica por patologías y por nombre comercial, ordenado alfabéticamente. Las que optan por la triple clasificación incorporan a su vez una lista con los productos más vendidos. La diferenciación entre estas webs se basa en el gran número de artículos ofertados a bajo precio.

El otro grupo de páginas están “especializadas” porque trabajan muy pocos productos, suponen el 45 %. Tienen una profundidad de surtido que va desde unas unidades, la menor encontrada es de 3 artículos, y habitualmente no suelen sobrepasar los 50 artículos. Todas ellas ofertan principalmente fármacos para la disfunción eréctil, y complementan su catálogo con productos para el tratamiento de la obesidad, fármacos para la deshabitación tabáquica, salud de la mujer, tratamiento alopecia... Estas páginas se diferencian de las primeras no solo por los artículos que constituyen su vademécum, sino por el precio. La media de precio de sus medicamentos es muy superior a las primeras. Utilizan los parámetros: oferta baja de producto a precio muy alto como elemento diferenciador, aportando al consumidor una imagen de garantía y seriedad (Figura 11).

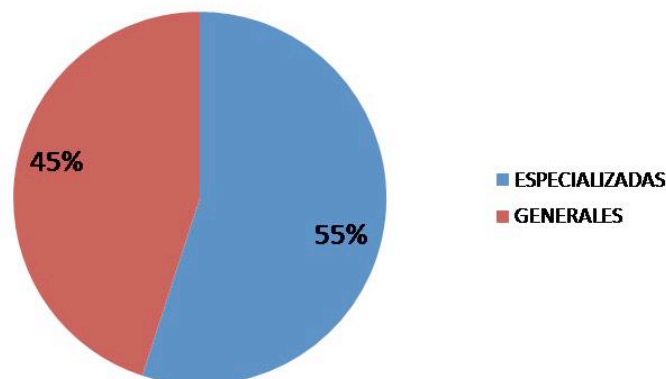


Figura 11. Surtido de productos: Especializadas (representada en azul), Generales (representadas en rojo).

3.12. Promociones

El 90 % de las páginas hacen promociones de sus productos, sólo el 10 % de ellas no lo hacen. Estas excepciones utilizan esto como elemento diferenciador para revestir a su página de mayor profesionalidad sanitaria.

Entre las que ofertan promociones a sus clientes podemos diferenciar de dos tipos, aquellas que hacen descuentos económicos, y otras que aplican al proceso de compra una bonificación en producto.

Encontramos que el 50 % de las páginas combinan ambos tipos de descuentos en precio y en producto. Promocionan el precio por unidad de envase y en un determinado tamaño de envase. A mayor tamaño de este, menor precio unitario del comprimido..., es decir, aplican un descuento proporcional al escalado de compra. Un 20 % de webs sólo aplican el descuento en precio y el otro 20 % solo promocionan en producto (Figura 12).

Estos descuentos incitan al autoconsumo masivo de fármacos, banalizando su utilización y apostando por la accesibilidad a los mismos simplemente condicionada por motivos económicos.

Con esta política de precios y promociones es muy difícil para el paciente comparar el precio de los productos *on line* entre sí y con los que se dispensan en las farmacias legalmente establecidas.

Es muy habitual la promoción en productos indicados para la disfunción eréctil, independientemente si el cliente de las webs ha demandado este tipo de medicamento. Así encontramos *pack* cerrados, formados por comprimidos de distintos medicamentos indicados para la anterior patología. El paciente “los prueba” a un “precio especial”. En otros casos a estos *pack* se les denomina “de bienvenida” y se envían gratuitamente con el primer pedido o cuando se recomienda la página a un amigo, es decir, premian el aumentar el flujo de clientes a la página.

Cuando la promoción es en precio la primera compra es premiada con un descuento especial o se acumulan para compras sucesivas.

También promocionan gratuidad de los gastos de envío cuando las compras son grandes, lo que repercute en el precio final del producto.

Utilizan todas las técnicas del marketing actuales para fomentar el crecimiento de negocio y la fidelización del cliente.

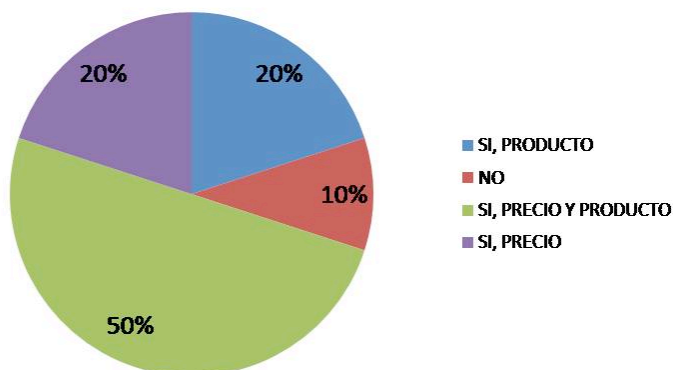


Figura 12. Tipo de promoción: Sí promoción en Precio y Producto (representado en morado), Sí promoción en Precio (representado en verde), Sí promoción en Producto (representado en rojo), No Promociones (representado en azul).

3.13. Formas de pago

En todas las páginas se garantiza el pago seguro. Solo el 70 % utiliza como único sistema de pago la tarjeta. En el 15 % de *sites* los pagos se pueden realizar tanto con tarjeta

como con transferencia bancaria, un 10 % combina el pago de tarjeta y contra reembolso y solo en un 5 % se paga a contra reembolso, lo que implica una garantía de envío (Figura 13).

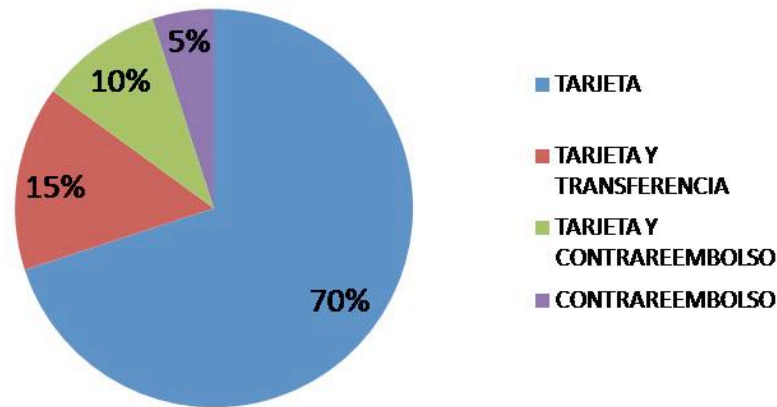


Figura 13. Formas de pago: Tarjeta (representado en azul), Tarjeta y transferencia (representado en rojo), Tarjeta y contra reembolso (representado en verde), Contra reembolso (representado en morado).

3.14. Asesoramiento médico o farmacéutico

El asesoramiento médico aparece en un 15 % de las páginas en las que se especifica que un médico le atenderá sus dudas *vía on line*. En ningún caso se utiliza un formulario médico de consulta.

Habitualmente no se exige receta médica aunque,

cuando excepcionalmente se hace, se indica que debe enviarse por fax o mail. Esta exigencia se desvanece al realizar la compra. En general, se vanaglorian de poder comprar sin prescripción y con garantía de alta calidad (Figura 14).

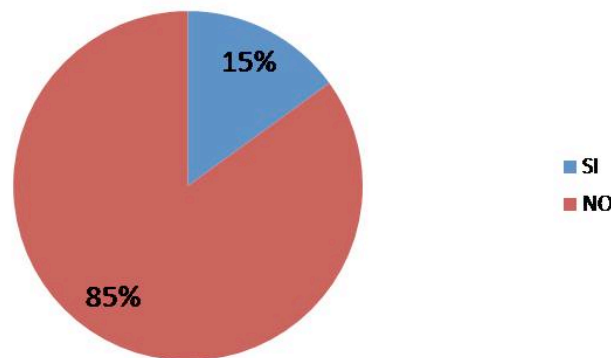


Figura 14. Asesoramiento médico o farmacéutico: No (representado en rojo), Sí (representado en azul).

3.15. Información sobre medicamento

La totalidad de las páginas web ofrecen información del medicamento, aunque varía la extensión de dicha información. Por ello, diferenciamos entre las que contienen todos los puntos de redacción de un prospecto

legal, que representarían el 70 % de los *sites web* y aquellas en las que solo aparecen algunas de estas indicaciones y que supondrían un 30 % de las webs (Figura 15).

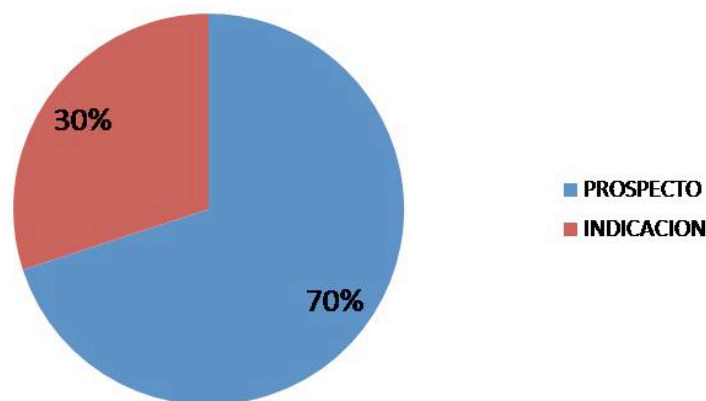


Figura 15. Información sobre medicamento: Prospecto (representado en azul), Indicación (representado en rojo).

En España los medicamentos están sometidos a un proceso de evaluación y registro previos a su comercialización para asegurar su calidad, eficacia y seguridad. Los laboratorios fabricantes e importadores y los distribuidores precisan rigurosas autorizaciones administrativas para realizar su trabajo. Esto dificulta la introducción de medicamentos falsos en la red de comercialización legalmente establecida. De hecho, por esta fuerte regularización en España, a diferencia de otros países como por ejemplo Reino Unido, Estados Unidos...(23), no se han encontrado medicamentos falsificados en el canal legal español. Sin embargo, la existencia de páginas de Internet, que venden medicamentos falsificados, no controladas por las autoridades, modifica los modelos tradicionales utilizados como garantía de seguridad, que buscan evitar que lleguen al consumidor final medicamentos falsos. En base a estos datos, hemos de proceder a la lucha contra estos medicamentos espurios de dos maneras distintas: una orientada hacia el canal legal y otra orientada al canal digital.

En cuanto al canal legal, la Directiva 2001/62/UE (24) regula las actuaciones para protegerlo y modifica la Directiva 2001/83/CE (25), que estableció un Código Europeo sobre productos médicos de uso humano, en cuanto a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en el suministro legal.

El nuevo marco legal en España para combatir la falsificación de medicamentos se basa en el Real Decreto 1/2015 de 24 julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos. Y en el Real Decreto 782/2013 de 11 de octubre, sobre la distribución de medicamentos de uso humano (26) y modifica también el Real Decreto 824/2010, sobre la fabricación de medicamentos (27), ya que se ha comprobado que la vía de entrada para los medicamentos falsificados en el canal legal se hace a través de la distribución.

Se completa esta regulación con el Reglamento Delegado (UE) 2016/161, de la Comisión de 2 de octubre de 2015, que completa la Directiva 2001/83/CE (28) sobre

dispositivos de seguridad que aparecerán en los envases. En un futuro, febrero 2019, cada caja de medicamento tendrá dos dispositivos de seguridad, uno de ellos identificador único, para verificar la autenticidad de cada envase individual del medicamento, y el segundo dispositivo contra las manipulaciones del envase. Estos dispositivos solo lo llevarán los medicamentos sujetos a dispensación con receta médica, por lo que servirá para diferenciar los envases de medicamentos falsificados con los reales.

Internet es la mayor vía de acceso a los medicamentos ilegales y falsificados, el 97 % de los sitios web son ilegales. De ellos 35.000 sitios están dirigidos a Europa y 50.000 a nivel mundial (29). Por sus características, es muy difícil luchar contra internet, a pesar de eso la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) cada año está haciendo más actuaciones sobre las páginas ilegales de venta de medicamentos. Las actuaciones de AEMPS se inician tras denuncias de ciudadanos, órganos de la administración, organizaciones profesionales o científicas, empresas o de oficio. Después de la denuncia se realiza una investigación y se adoptan las medidas oportunas, como pueden ser la interrupción del servicio y el cese de la actividad ilícita o la limitación del acceso a la página web. Para ello se debe contar con servidores como Google..., redes sociales: Twitter, Facebook..., plataformas de venta al consumidor..., etc., y, aunque es complicado porque están fuera del ámbito sanitario, existe por parte de todas estas entidades una disposición cada vez mayor de perseguir el tráfico ilegal de medicamentos en internet.

Otra forma de lucha son los diferentes proyectos internacionales para luchar contra este fraude de medicamentos falsificados. A nivel europeo existe un proyecto denominado Fakeshare (30), que tiene el objetivo de informar sobre el fraude y los riesgos de los medicamentos falsificados. En este proyecto se han unido tanto las administraciones sanitarias españolas como también las oficinas de farmacia.

4. CONCLUSIONES

Con este estudio podemos concluir que tanto la primera como la segunda hipótesis planteada se han resuelto positivamente. Ya que todos los atributos con los que hemos elaborado el estudio son muy similares en todas las páginas webs, y además se pueden agrupar e identificar todos en las tres dimensiones establecidas: entorno web, entorno sanitario y entorno comercial. Además, podemos establecer que los atributos percibidos por los públicos son similares entre las web, creando una unidad de concepto de página web de venta de medicamentos.

En España la vía de entrada de medicamentos ilegales es a través de la compra en páginas webs ilegales. Para luchar contra este fraude, el farmacéutico comunitario es el personal cualificado más cercano a la población. Este debe de conocer los mecanismos para alertar a las autoridades sanitarias: AEMPS, cuando detecte o tenga conocimiento de una alarma de este tipo. Y debe formarse en este ámbito para informar y concienciar a la población sobre los riesgos y graves perjuicios que este tipo de medicamentos pueden ocasionar en los pacientes consumidores.

5. REFERENCIAS

- Zamora H, Granada E, Gonzales C. Cómo están contempladas las garantías de abastecimientos. In: García, M. Curso básico de derecho farmacéutico. Madrid: Ed. Instituto de Legislación farmacéutica S.L. 2014; pp.326-333.
- Bergel S.D. Bioética y el derecho humano de acceso a los medicamentos, en Actas del IV Congreso Mundial de Bioética, SIBI, Gijón 2005; pp.170-190.
- Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado, 25 de Julio de 2015, n. 177, pp. 62935-63030.
- Castillo Rodríguez C. El peligro sanitario provocado por la falsificación de medicamentos. Granada: Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 2012.
- OMS. La falsificación de medicamentos: una amenaza creciente. Online: <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/4/10-020410/es/>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Estrategia frente a medicamentos falsificados 2016-2019-AEMPS Online: http://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/Estrategia_falsificados_2016-2019.pdf
- Online: <http://www.excelsior.com.mx/global/2014/08/02/974100>
- Travaglini M. La logística en las empresas virtuales. Tesis doctoral. Málaga: Universidad de Málaga 2016.
- Vázquez Casielles R. Trespalacios Gutiérrez J.A.Estrategias de distribución comercial: diseño del canal de distribución y relación entre fabricantes y detallistas. Madrid: Thomson 2006; p.141
- Real Decreto 870/2013, por el que se regula la venta a distancia al público, a través de sitios web, de medicamentos de uso humano no sujetos a prescripción médica. Boletín Oficial del Estado, de 9 de Noviembre de 2013, n.269, pp. 90156-90163
- Interpol: Operación internacional contra el suministro en línea de medicamentos falsos e ilegales. On line: <https://www.interpol.int/es/Centro-de-prensa/Noticias/2010/PR083>.
- Arts. 359 a 378 de la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. Boletín Oficial del Estado de 24 de Noviembre de 2015, n. 281.
- Directiva 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del consejo de 8 de junio de 2011 que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro de la Unión Europea L 174/74 de 1 de Julio de 2011.
- Echtner C, Richie J. The meaning and measurement of destination image. Journal of Tourism Studies 1993; 4 (2), 2-12
- Pérez Cabañero C. El riesgo percibido ante la compra de bienes y servicios. EsicMarket 2008; 129, 183-218.
- Fuentes Martín F, Lozano Gutiérrez MC. La imagen de marca en el valor de la empresa de internet. EsicMarket 2005; 121: 219-264.
- Alameda Abejon P, Olarte Pascual C, Reinares Lara EM, Saco Vázquez M. Notoriedad de marca y medios de comunicación. Esic Market 2006; 124, 91-115.
- Traffic on line. Online <http://www.jano.es/ficheros/jano/traffic>
- Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG y col. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. J Urol 1994; 151: 54-61
- Interpol Una operación coordinada por Interpol contra la delincuencia organizada se salda con la incautación de 20 millones de medicamentos ilícitos. On line: <https://www.interpol.int/es/Centro-de-prensa/Noticias/2015/N2015-082>
- Cracking Counterfeit Europe- Pfizer. On line https://www.pfizer.es/docs/pdf/noticias/DossierdePrensa_Medicamentos_Falsificados.pdf
- Medicamentos falsificados. Pautas para la formulación de medidas para combatir los medicamentos falsificados. On line: <apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2968s/>
- On-line: <https://www.phmk.es/falsificacion-de-medicamentos/>
- Directiva 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del consejo de 8 de Junio de 2011 que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal. Diario Oficial de la Union Europea L 174/74 de 1 de Julio de 2011.
- Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del consejo de 6 de Noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos

- para uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea L 311 de 28 de Noviembre de 2001, p.67.
26. Real Decreto 782/2013 de 11 de octubre, por el que se regula la distribución de medicamentos de uso humano. Boletín Oficial del Estado 19 de octubre de 2013; 251, 85277-85297.
 27. Real Decreto 824/2010 de 25 de junio, por el que se regulan los laboratorios farmacéuticos, los fabricantes de principios activos de uso farmacéutico y el comercio exterior de medicamentos y medicamentos en investigación. Boletín Oficial del Estado 8 de julio de 2010; 165, 59986-60013.
 28. Reglamento Delegado (UE) 2016/161, de la Comisión de 2 de octubre de 2015, que completa la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo estableciendo disposiciones detalladas relativas a los dispositivos de seguridad que figuran en el envase de los medicamentos de uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea L.32/1, de 9 febrero de 2016.
 29. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Estrategia frente a medicamentos falsificados 2012-2015. On line: http://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/Estrategia_falsificados_2012-2015.pdf
 30. Proyecto Europeo Fakeshare. On line: www.fakeshare.eu/es/.



Posible papel del microbioma en el eje cerebro/intestino



Ana M.ª Pascual-Leone Pascual
Coordinadora de la sesión
Mesa redonda celebrada el 15 de junio de 2017
e-mail: anamariapascualleone@gmail.com

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

Excma. Sra. Dña. Ana María Pascual-Leone
Investigadora del CSIC y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

“El hombre y los microorganismos: el eje cerebro/intestino”

Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón
Catedrático de Microbiología, Prof. Emérito de la Universidad de Valencia y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

“Regulación directa de la actividad hipotalámica por la microbiota intestinal detectada mediante imagen y espectroscopia de resonancia magnética”

Excmo. Sr. D. Sebastián Cerdán García-Esteller
Profesor de Investigación del CSIC y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Presentación

Ana María Pascual-Leone Pascual

Excmo Sr. Presidente de la Academia Nacional de Farmacia, Excmas. Señoras y Señores Académicos, Sras. y Sres.:

Por el hábito en esta Institución de divulgar cuestiones sanitarias de vanguardia científica, se ha hablado ya varias veces de microbioma.

Por primera vez, creo, habló de microbioma el Excmo. Dr. Sentandreu en abril del 2013, en la Mesa Redonda titulada “ Sinbiogénesis y bacteriomas” y, también, en su magnífico discurso con motivo de su entrada como Académico de Número. Muy recientemente, el Excmo Sr. D. César Nombela volvió a hacerlo en la clausura del curso sobre obesidad.

Por ello cabe preguntarse: **¿Por qué este tema y por qué este título?**

Porque los nuevos y recientes estudios sobre el microbioma humano como conjunto de bacterias, virus, hongos y protozoos que habitan sobre el cuerpo del hombre prometen ser pieza importante para las relaciones, muchas ya establecidas, entre el cerebro y el intestino. El microbioma fue descubierto hace más de un siglo cuando se describió ya que los animales que no lo tenían, *gnotobióticos*, se desarrollaban mal, especialmente, en su sistema inmune y en su tracto intestinal.

Las nuevas conclusiones sobre estos estudios solo se han podido realizar recientemente, cuando se conoce la estructura del material genético, y cuando se han habilitado también las técnicas necesarias para el estudio de estos microorganismos en su nicho ecológico, y no en cultivos *in vitro*.

Las conclusiones sobre el microbioma recientes parecen abrir posibilidades terapéuticas en diversas y significativas patologías, pero, sobre todo, en las concernientes al axis cerebro/intestino en donde, actualmente, sabemos que reside el control del balance energético.

Se puede decir que el estudio del microbioma comenzó con el cambio de milenio en 2001. El Premio Nobel Dr. Lederberg acuñó el término microbioma por primera vez y sugirió que los microorganismos que habitan en el cuerpo humano deberían ser incluidos como parte de su genoma por la influencia que ejercen en su fisiología.

Las primeras publicaciones sobre microbioma comenzaron en 2007-8. De todo ello les hablará el Dr. Sentandreu, con gran conocimiento de causa. Es Catedrático de Microbiología y, actualmente, Profesor Emérito de la Universidad de Valencia, posee una amplia formación microbiológica. Sus investigaciones, tanto en España como en su periodo formativo en el extranjero, se han efectuado en dicha vertiente. Así como sus múltiples trabajos publicados y algunas patentes.

Es Doctor por la Universidad de Cambridge y fue

Research Associate en Waskman Institute of Microbiology, Rutgers Universidad de New Jersey en USA. Posteriormente en España ha sido Catedrático de Microbiología en Barcelona y en Valencia, donde, junto con su mujer, Investigadora del CSIC, desarrollaron una intensa labor investigadora. Tiene 43 Tesis doctorales dirigidas y 27 capítulos de libros de la especialidad. Además del Premio Severo Ochoa en 1988 y el Alberto Sols a la Mejor Labor Investigadora en Ciencias de la Salud en 1994.

¿Por qué este tema?

En la fisiología humana, y, en general, en la de mamíferos, una de las cuestiones más importante a salvaguardar para la salud es el balance energético y, hoy, estamos en condiciones de afirmar que dicho equilibrio energético se regula por el eje peptinérgico cerebro/intestinal.

El conocimiento de la regulación de la homeostásis energética es necesario para tratar la obesidad patológica, que, a su vez, es un factor de riesgo para patologías como la diabetes, cardiovasculares y ciertas neoplasias. Pero, además, la salvaguarda del balance energético es básica y esencial en periodos de desarrollo y crecimiento de los mamíferos, como sabemos los investigadores perinatalistas. Y todo ello sitúa al aparato digestivo y a sus relaciones con el cerebro en primera línea de cuestiones terapéuticas a investigar.

Desde finales del siglo XX, y lo que llevamos del XXI, se ha profundizado en dichas relaciones cerebro/intestino, y se ha llegado al establecimiento del eje peptinérgico correspondiente.

Por espacio de más de cuarenta años hemos asistido al hallazgo de neuropéptidos que se encuentran en el cerebro, concretamente en el hipotálamo, pero que, también, algunos son secretados en el intestino, como la colecistoquinina, las β -endorfinas, orexinas o algunos neurotransmisores, como el glutamato, por citar algunos. En 1953 se estableció que en los mamíferos existía un sistema adipostático por el cual el equilibrio entre la ingesta y la energía gastada permite mantener estable la masa adiposa. Y experiencias, dañando el hipotálamo en roedores, mostraban que en dicho sistema adipostático existía una implicación cerebral.

El descubrimiento de la leptina, en 1994 (1), el producto del gen *ob* de los adipocitos, y también de sus receptores, vino a aclarar muchas cuestiones acerca de la regulación, a través del cerebro, del equilibrio energético. Se estableció cómo la leptina y la insulina rinden cuenta al cerebro del nivel de la materia grasa existente, ya que ambas aumentan paralelamente a ella. La leptina pertenece a la familia de las citoquinas, concretamente, de la interleuquina-6 y estimula, además, la proliferación de timocitos. Se secreta en el tejido adiposo, pero, también,

en la placenta, tejido esquelético, la pared del estómago y en el epitelio mamario. Ni la leptina ni la insulina se han encontrado en cerebro, pero si existen en él, profusamente, sus receptores. La leptina y la insulina secretadas en la periferia suben al cerebro por transcitosis a través del líquido cefalorraquídeo.

Hoy sabemos que existe un sistema de regulación del balance energético a largo plazo que consigue mantener las reservas grasas estables con la apertura o no de la ingesta, y que está liderado por leptina e insulina. Pero que, también, existe un sistema para salvaguardar el equilibrio energético a corto plazo efectuado por una gran cantidad de neuropépticos llamados orexigénicos, si abren el apetito, y anorexigénicos si lo cierran, pero, además, ambos sistemas cooperan.

Entre los más importantes orexigénicos está el péptido Y (NPY), que se segrega en el núcleo arcuato del hipotálamo y se almacena en el paraventricular. El sistema cerebral catabólico que cierra el apetito es el Sistema Melanocortina Central, concretamente la alfa-melanocortina derivada de la molécula POMC (proopiomelanocortina) secretada en el núcleo arcuato. No nos podemos entretener por razones de tiempo, pero recomiendo a los interesados en el tema la monografía n.º XVIII de esta Academia que coordiné en el año 2005. La Monografía se titula “Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías”.

En 1998 fueron descubiertas las orexinas (2) que se secretan en el hipotálamo lateral, así como en neuronas y células secretoras del intestino, estómago y páncreas, las cuales parecen tener un papel integrador de las dos vías para modular el equilibrio energético. Las orexinas están implicadas en el transporte al cerebro de las respuestas intestinales. El estudio del desequilibrio de ellas es fundamental en patologías como la narcolepsia, ya que son orexigénicas, abren el apetito, pero a su vez producen vigilia regulando el sueño.

Al hablar de animales gnotobióticos, que carecen de microbioma, hemos dicho que se desarrollan mal, sobre todo, en el sistema inmune y el tracto intestinal. Y consecuentemente en esta Mesa Redonda nos estamos preguntando si la microbioma intestinal juega algún papel en la ligazón tan enorme que existe, aún no completamente conocida, entre el intestino y el cerebro. En 2016 en un *Annual Review of Physiology* se puede leer un trabajo titulado “Inflamación hipotalámica en el control de funciones metabólicas” firmado por Martín Valdearcos y colaboradores en el Diabetes Center de la Universidad de California (3); en este trabajo se habla de que la sobrenutrición produce inflamación en los tejidos periféricos diana de la insulina y que, al tratar dicha inflamación, se consigue preservar la sensibilidad a la insulina en los obesos. Estudian la inflamación por exceso de dieta en células localizadas en el hipotálamo medio basal, donde se encuentra el núcleo arcuato, el área cerebral que controla el metabolismo periférico de glucosa, grasa y energía por sus secreciones de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos Comparan las diferencias

entre la inflamación periférica y la cerebral e intentan contener la inflamación hipotalámica para mejorar patologías metabólicas.

Y en 2015 encontramos un estudio, “Células enteroendocrinas: quimiosensores en el epitelio intestinal” (4), donde se puede leer la importancia del conocimiento de las células enteroendocrinas o células endocrinas del intestino, para el entendimiento de la patofisiología y terapéutica del axis que ellos llaman “intestino-cerebro-páncreas”. Claramente, cuanto más se investiga, más amplio es el conocimiento de la gran unión y relación entre el cerebro y el intestino en determinadas vertientes.

En este contexto es normal que ante la aparición del microbioma intestinal, el más abundante en microorganismos del cuerpo humano, nos preguntemos qué papel pueda representar en este equilibrio tan interconectado entre cerebro e intestino. Y, además, en un momento en que, realmente aún existen muy pocas publicaciones sobre la microbiota intestinal.

Por ello el segundo ponente les va a exponer trabajo propio sobre dicho tema, mostrando que, como pensábamos, el microbioma intestinal, un factor externo que vive dentro del intestino, colabora en funciones de equilibrio energético a nivel cerebral.

El Dr. Sebastián Cerdán García-Esteller es Profesor de Investigación del CSIC y es el responsable del laboratorio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo (LIERM) del CSIC desde 1989.

Lleva muchos años trabajando en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, de cuyo centro fue Director, y ha sido también Vocal y Presidente de la Sociedad Europea de Resonancia Magnética y miembro del Consejo Directivo de la Sociedad Internacional de Resonancia Magnética en Medicina. Se formó en la Universidad de Pennsylvania y en Suiza, Universidad de Basel, con una beca EMBO. Es autor de muchos artículos siempre de la misma temática. Su objetivo general es el desarrollo y evaluación de nuevas aplicaciones biomédicas de la Resonancia Magnética, y lleva muchos años trabajando en imagen y espectroscopia en dicha vertiente. Podríamos decir que es un ejemplo actual, sin duda, de la buena ciencia española que realizamos, como lo ha sido también el Dr. Sentandreu.

Al Dr. Cerdán lo vamos a oír en un tema propio y puntero, como es la microbiota intestinal interactuando a nivel cerebral, de lo cual, además, a nivel mundial, existe aún muy poca bibliografía y trabajos realizados. Y dado que fue publicado en *Nature Communications* nos remitimos a la publicación en inglés para su consulta (5).

Bibliografía

1. Pascual-Leone AM. Balance energético: Leptina. *Anal Real Acad Nac Farm* 2003; 69: 257-87.
2. Pascual-Leone AM. Eje cerebro-intestinal: orexinas. *Anal Real Acad Nac Farm* 2004; 70: 905-31.
3. Valdearcos M, and col. Hypothalamic Inflammation in the control of Metabolic Function. *Annu Rev Physiol* 2015; 77: 131-60.

4. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Ann Rev Physiol* 2016; 78: 277-99.
5. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdán S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Thomas EL, Bell JD. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* 2014 Apr 29; 5: 3611. doi: [10.1038/ncomms4611](https://doi.org/10.1038/ncomms4611).

El hombre y los microorganismos: el eje cerebro-intestino

Title in English: *Man and microorganisms: the gut-brain axis*

Rafael Sentandreu Ramón

Profesor Emérito de la Universidad de Valencia y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: Bacteria have colonized *Homo sapiens* as parasites (causing disease and death) and also as mutualists (microbioma). As a mutualist the microbioma is used as a marker of specific diseases and it is proposed the existence of a microbiota-intestine-brain axis whose incorrect functioning is responsible for brain disorders: behavior, anxiety, depression, multiple sclerosis, Alzheimer's disease... Among the possible intermediates that connect the intestine with the brain are the immune system, neuropeptides and microbial metabolites. The connection to the brain can be channeled through the vagus nerve but also through the autonomous nervous system. Human brain images have been obtained that relate the composition of the microbiota to emotion, and we now need the studies done with rodents to be extended to humans in order to confirm that probiotics have an effect on mental health. The microbiome is part of a mutualistic ecosystem necessary to *Homo sapiens* so that it can survive as a species.

RESUMEN: Las bacterias han colonizado al *Homo sapiens* como parásitos (provocando la enfermedad y la muerte) y también como mutualistas (microbioma). Como mutualistas el microbioma se utiliza como marcador de enfermedades específicas, y se propone la existencia de un eje microbiota-intestino-cerebro cuyo funcionamiento incorrecto es responsable de trastornos cerebrales: comportamiento, ansiedad, depresión, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer... Entre los posibles intermediarios que conectan el intestino con el cerebro se encuentran el sistema inmunitario, neuropeptidos y metabolitos microbianos. La conexión con el cerebro puede canalizarse por el nervio vago pero también por el sistema nervioso autónomo. Se han obtenido imágenes cerebrales en humanos que relacionan la composición de la microbiota con la emoción y actualmente necesitamos que los estudios realizados con roedores se amplíen a humanos para poder confirmar que los probióticos tienen efecto sobre la salud mental. El microbioma forma parte de un ecosistema mutualista necesario al *Homo sapiens* para que pueda sobrevivir como especie.

Corresponding Author: rafael.sentandreu@uv.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 3 (2017), pp. 360-370

Es interesante recordar un fenómeno que todos hemos experimentado en algún momento de nuestra vida. Me refiero que ante una situación de tensión emocional, nuestro sistema nervioso intestinal reacciona al unísono sugiriéndonos la existencia de algún tipo de conexión entre ambos, el cerebro y el intestino. Pero lo verdaderamente significativo es que hasta hace relativamente poco tiempo

no se habían obtenido datos adecuados que apoyaran la idea de que las responsables de este efecto fueran las bacterias intestinales. La Figura 1 incluye la definición de algunos de los términos más significativos que se utilizan en este trabajo.

TÉRMINOS

El término **microbioma** incluye a todos los microorganismos, procarióticos y eucarióticos y su material genético, presentes en los diferentes ecosistemas del cuerpo.

El término **microbiota**, incluye al total de la población microbiana presente en los diferentes ecosistemas del cuerpo.

Probióticos son microorganismos vivos que, cuando se ingieren en las cantidades adecuadas, pueden aportar beneficios para la salud de quien los consume. Se trata de bacterias o levaduras que están presentes en alimentos, medicamentos o suplementos dietéticos.

Fig. 1

En la Figura 2 se presenta el árbol filogenético universal de acuerdo con el sistema de tres dominios: bacterias, archaeas y eukarya (Eric Gaba (Sting - fr:Sting) - NASA Astrobiology Institute.

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=26075698>). Este árbol se construyó a partir de la comparación de las secuencias de RNA ribosómico 16S y 18S y nos recuerda que los primeros habitantes de nuestro planeta

fueron bacterias que aparecieron hace unos 3.500 millones de años y durante más de 2.000 millones fueron básicamente sus únicos habitantes. En el árbol filogenético descubrimos como los seres vivos fueron evolucionando

hasta llegar al *Homo sapiens* y todos, conforme aparecieron, tuvieron que adaptarse a convivir con los anteriores pobladores.



Las bacterias son no solo los organismos más antiguos y más abundantes del planeta sino que además son unicelulares, microscópicos, y debido a su naturaleza haploide, son los que más fácilmente se adaptan a las condiciones del medio y a la convivencia con otros seres vivos. Las bacterias son ubicuas y las encontramos en todos los hábitats terrestres, acuáticos y aéreos. Las bacterias, y en general muchos microorganismos, son uno más en nuestras casas, las traen nuestros amigos, las encontramos en el teléfono móvil, en la paella que nos comemos o las intercambiamos con el beso con que saludamos a nuestros íntimos.

¿Qué buscan los microorganismos que cohabitan con nosotros? Como es obvio cumplen con la ley básica de la biología: todas las especies deben alimentarse y

reproducirse lo más rápidamente posible a fin de evitar ser desplazados del nicho ecológico correspondiente. Las bacterias buscan ocupar nuevos nichos adaptándose al mismo; esta adaptación en el caso de las bacterias que colonizan al *Homo sapiens* se ha podido consumir mediante tres mecanismos: 1. Parasitismo en el que la relación entre el hombre y las bacterias es tal que estas últimas (el parásito) obtiene beneficios. Frecuentemente el hombre (el huésped) recibe un daño que puede provocar su muerte. 2. Comensalismo en que la relación es beneficiosa para la bacteria e indiferente para el hombre, y 3. Mutualismo en que la relación entre la bacteria y el hombre es beneficiosa para ambos y en ocasiones uno o ambos terminan siendo estrictamente dependientes (Figura 3).

Simbiosis

(del griego: syn, 'juntos' y biosis, 'vivir') se aplica a la relación persistente entre organismos de diferentes especies.

Parasitismo es la relación entre individuos de diferentes especies en la cual la que una de ellas (parasito) obtiene beneficios. Frecuentemente el hospedador recibe un daño que puede provocar su muerte.

Comensalismo la relación es beneficiosa para una de ellas e indiferente para la otra.

Mutualismo es una relación entre individuos de diferentes especies, en donde ambos se benefician y en ocasiones uno o ambos terminan siendo estrictamente dependientes.

Fig. 3

¿Si convivimos con las bacterias cuál ha sido históricamente nuestra relación con ellas y con los microorganismos en general?

Una manera de acercarnos a la relación que ha existido es contrastar la esperanza de vida que ha tenido el *Homo sapiens* desde el paleolítico hasta nuestros días, es decir desde hace más de dos millones de años hasta el siglo XXI.

La esperanza de vida media al nacer los miembros de la sociedad humana desde el paleolítico superior hasta hace un siglo no superaban los 30 años de edad si bien se contabilizaban personas que superaban con creces la media de la población. La Historia nos dice que tanto en la Grecia y Roma antiguas como durante el Renacimiento y la

Eras	Esperanza de vida media al nacer (años)
Paleolítico superior	33
Neolítico ⁵	20
Edad del Bronce ⁶	35
Grecia Clásica ⁷	28
Antigua Roma ⁷	28
Norteamérica Precolombina ⁸	25-30
Califato Islámico medieval ⁹	20+
Gran Bretaña en la edad Media ^{13 14}	30
Inicio del siglo XIX ^{15 16}	30-40
Inicio del siglo XX ^{17 18}	50-65
Media Mundial actual ¹⁹	71.4

Fig. 4

Desde la introducción de la vacunación y la utilización de los antibióticos la esperanza de vida media de las comunidades desarrolladas al nacer, y la esperanza de vida media individual, se ha igualado demostrándose de una manera convincente que las bacterias se adaptaron a convivir con *Homo sapiens* al menos como parásitos (Figura 5).

Sin embargo, hace ya más de 100 años que se encontró en individuos sanos, sobre todo en sus heces, la presencia de bacterias.

¿Qué están haciendo ahí esas bacterias? ¿Por qué no provocan la muerte?

Se demostró que la mayoría de las bacterias detectadas no podían cultivarse en el laboratorio. Si recordamos que, además del parasitismo, nuestra relación con las bacterias puede ser comensalismo o mutualismo y, dado que gran parte de las especies presentes en las heces no crecen “in vitro”, se fortalece el criterio de que muchas de ellas pudieran ser estrictamente dependientes del huésped, es decir, tuvieran una relación de mutualismo con el hombre. Hoy sabemos que diversos microorganismos colonizan el

Ilustración encontramos individuos que vivieron más de 70 años (Figura 4).

¿A qué se debió esa gran diferencia entre la esperanza de vida media de la población al nacer y la esperanza de vida individual? Hoy sabemos que entre las posibles razones se encuentran las guerras, las hambrunas y las enfermedades.

Hubo de esperar a los trabajos de Louis Pasteur y Robert Koch para confirmar el origen microbiano de las enfermedades infecciosas, confirmación que fue revalidada con el descubrimiento de la vacunación por Edward Jenner, y por el descubrimiento de los antibióticos por Alexander Fleming (penicilina) y Selman Abraham Waksman (actinomicina, estreptomycinina y neomicina) y otros.

Años de vida		
Tales de Mileto	78 años	625-547 a.C
Pitágoras	94 años	569-475 a.C
Sócrates	71 años	470-399 a.C
Platón	80 años	427-347 a.C
Averroes	72 años	1126-1198
Ibn Amira	74 años	1186-1260
Miguel Ángel	88 años	1475-1564
Galileo Galilei	77 años	1564- 1642
Isaac Newton	84 años	1642-1727
Charles Darwin	73 años	1809-1882
Esperanza de vida INDIVIDUAL 79 años		
Santiago Ramón y Cajal	82 años	
Alexander Fleming	74 años	
Ernest N Chain	73 años	
Severo Ochoa	89 años	
Francis Crick	88 años	
Esperanza de vida INDIVIDUAL 81 años		

cuerpo humano tras el nacimiento, permaneciendo en él en condiciones normales de salud a lo largo de su vida.

¿Qué microorganismos colonizan nuestro cuerpo?

Ante la dificultad de poder determinar la microbiota (la población total microbiana presente en los diferentes ecosistemas del organismo) por las técnicas ordinarias de la microbiología fue necesario, primero, que Watson y Crick propusieran en 1953 (1) la estructura del material genético, segundo, que Woese y Fox, en 1977 (2), propusieran que la secuencia del gen de 16S de RNA ribosómico de los organismos procariontes podía utilizarse en su clasificación taxonómica (posteriormente se demostró que el gen equivalente de 18S de los eucariotas también es válido en la taxonomía de los organismos superiores incluyendo al *Homo sapiens*) y, tercero, que se desarrollaran técnicas genéticas adicionales que permiten determinar el total de los genes que se encuentran en un nicho ecológico, sin necesidad de crecer los microorganismos en el laboratorio y con la información obtenida deducir los productos codificados y las especies.

Datos publicados en 2015.†

Puesto general	País	Esperanza de vida general	Puesto esperanza de vida de varones	Esperanza de vida de varones al nacer	Puesto esperanza de vida de mujeres	Esperanza de vida de mujeres al nacer
1	Japón	84	1	80	1	87
2	España	84	1	80	2	86
3	Andorra	84	1	80	2	86
4	Australia	83	2	81	4	85
5	Suiza	82	2	81	4	85
6	Italia	83	5	80	4	85
7	San Marino	83	5	80	4	85
8	Singapur	82	5	80	4	85
9	Francia	83	15	79	11	85
10	Mónaco	83	15	79	11	85

Fig. 5

En el año 2000 el premio Nobel Joshua Lederberg (3) sugirió que los microorganismos que habitan en el cuerpo humano, y que llamó microbioma, deberían ser incluidos como parte de su genoma debido a la influencia que tienen sobre su fisiología. Otros investigadores le llaman «el órgano perdido» y «el genoma extendido».

En 2007 los Institutos Nacionales de la Salud de los

Estados Unidos presentaron un proyecto con la finalidad de caracterizar completamente la microbiota humana y determinar su papel en la salud y en la enfermedad (NIH HMP Working Group. 2009). Además, se creó el Consorcio Internacional del Microbioma Humano (IHMC) cuyos trabajos se iniciaron oficialmente en septiembre de 2008 con 10 países participantes (Figura 6).

En 2007 los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos presentaron un **proyecto** con la finalidad de caracterizar completamente la microbiota humana y determinar su papel en **la salud y en la enfermedad** (NIH HMP Working Group. 2009).

Además se creó el **International Human Microbiome Consortium**, (IHMC), cuyos trabajos se iniciaron oficialmente en **septiembre de 2008 con 10 países participantes**.

Fig. 6

Los resultados obtenidos han confirmado que en nuestro cuerpo se encuentran más de 1.000 especies distintas de bacterias y que aproximadamente 100 billones de microorganismos que codifican aproximadamente 3 millones de genes (el genoma humano contiene unos 23.000 genes) (Figura 7). A pesar de tener más bacterias que células propias, el microbioma (el conjunto de microorganismos más sus genes) tan solo representa unos 200 gramos. Lo que es significativo es que la gran mayoría de estos microorganismos son responsables de funciones vitales, como son la expresión de determinados genes de los que carecen las células humanas y de su participación en la prevención de enfermedades.

El conocimiento aportado por el proyecto sobre el microbioma humano se usa hoy como marcador de

enfermedades específicas y recientemente se ha propuesto la existencia de un eje intestino-cerebro (Figura 8). El funcionamiento incorrecto de este eje, que denominamos eje microbiota-intestino-cerebro, es el responsable de los trastornos gastrointestinales (4), de las enfermedades inflamatorias intestinales (5), obesidad y síndrome metabólico (6) (Figura 8). Pero lo más significativo es que el eje microbiota-intestino-cerebro está implicado directamente en trastornos cerebrales no gastrointestinales, como en el comportamiento, la ansiedad y la depresión, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el autismo (7-11), sugiriendo que la microbiota intestinal se comunica directamente con el sistema nervioso central (SNC) influenciando la función y comportamiento del cerebro.

¿Qué microorganismos colonizan nuestro cuerpo?

Nuestro cuerpo se encuentran más de 1.000 especies distintas de bacterias y que aproximadamente 100 billones de microorganismos que codifican aproximadamente 3 millones de genes (el genoma humano contiene 23.000 genes). A pesar de tener más bacterias que células propias, el microbioma (el conjunto de microorganismos más sus genes) tanto solo representan unos 200 gramos pero la gran mayoría son responsables de funciones vitales como la intervención en la expresión de genes y prevención de enfermedades; es por ello por lo que el microbioma también ha sido llamado «el órgano perdido» y «el genoma extendido».

Fig. 7

EJE MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO MARCADOR DE ENFERMEDADES

Alteraciones en el funcionamiento del eje microbiota-intestino-cerebro son responsables de trastornos gastrointestinales (Mayer y Tillisch, 2011), de enfermedades inflamatorias intestinales (Mayer et al., 2014), obesidad y síndrome metabólico (Yau et al., 2012). **Además, la microbiota también está implicada en trastornos cerebrales no gastrointestinales, como la ansiedad y la depresión, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el autismo (Cryan y Dinan, 2012, Naseribafrouei et al., 2014, Jiang et al., 2015, Mayer et al., 2015, Scheperjans et al., 2015).**

Fig. 8

A fin de conocer algunos aspectos del funcionamiento el eje microbiota-intestino-cerebro diversos grupos de investigación han modificado la microbiota o recurrido al suplemento de probióticos (microorganismos vivos que cuando se ingieren en las cantidades adecuadas, pueden aportar beneficios para la salud de quien los consume; se trata de bacterias y/o levaduras que están presentes en alimentos, medicamentos o suplementos dietéticos) para

determinar su efecto sobre la ansiedad y el comportamiento, ambos como medida de su influencia en la función cerebral. Como resultado de la información obtenida hoy se proponen tres vías posibles de conexión del intestino con el cerebro, a través del sistema inmune, de la vía endocrina y con la participación de metabolitos microbianos (Figura 9).

EJE MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO

Vías posibles de conexión

1. Sistema inmune.
2. Sistema endocrino
3. Metabolitos microbianos

Fig. 9

EL EJE MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO Y EL SISTEMA INMUNITARIO

Hoy conocemos datos clave sobre la implicación del sistema inmune en el funcionamiento del eje microbiota-intestino-cerebro. Ya en el 2012 Cryan y Dinan (12)

obtuvieron resultados que sugerían la existencia de vías en el intestino que juegan un papel importante en la señalización de la microbiota al cerebro. Estos estudios revelaron, cómo variaciones y cambios en la composición de la microbiota intestinal influyen no solo en la fisiología

normal, sino que contribuyen a procesos patológicos como la inflamación y la obesidad pero sobre todo, que implican el que la microbiota intestinal pueda comunicarse directamente con el sistema nervioso central (SNC), a través del sistema inmune (12). Sin embargo el hecho de que la administración de un microorganismo a un individuo garantiza prácticamente siempre la respuesta inmune provocó un gran interés en esta línea de investigación para que confirmara los resultados descritos (13).

Actualmente contamos con datos reveladores que relacionan el papel del sistema inmunitario con el

comportamiento, en lo que denominamos “neurociencia de la conducta”, datos que obtenidos con trabajos utilizando ratones con la delección de genes implicados en la maduración de anticuerpos, como el gen RAG-1 que genera animales carecen de células T y B maduras manteniéndose silenciado el sistema inmune adaptativo; estos ratones a pesar de ello muestran una reducción en la ansiedad (14). Si a estos resultados añadimos los obtenidos por otros autores (15-17) es razonable concluir que hoy ya tenemos datos suficientes que confirman el papel del sistema inmune en el comportamiento a través del eje microbiota-intestino-cerebro (Fig. 10).

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO Y EL SISTEMA INMUNITARIO

Hoy contamos con datos reveladores que relacionan el papel del sistema inmune con el comportamiento, en lo que denominamos "neurociencia de la conducta", datos obtenidos con trabajos utilizando ratones con la delección de genes implicados en la maduración de anticuerpos, como el gen RAG-1 que genera ratones carecen de células T y B maduras manteniéndose silenciado el sistema inmune adaptativo; estos ratones a pesar de ello muestran una reducción en la ansiedad. Si a estos resultados añadimos los obtenidos por otros autores (Sankar et al., 2012, Rilett et al., 2015, De Leon-Nava et al., 2009) es razonable concluir que hoy ya tenemos datos suficientes que confirman definitivamente el papel del sistema inmune en el comportamiento a través del eje microbiota-intestino-cerebro

Fig. 10

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO Y SISTEMA ENDOCRINO

Los neuropéptidos son mediadores importantes tanto dentro del sistema nervioso como entre las neuronas y otros tipos de células como las endocrinas en el tracto gastrointestinal y otros órganos endocrinológicamente activos. Los neuropéptidos tales como la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el neuropéptido Y (NPY), el polipéptido intestinal vasoactivo, la somatostatina y el factor liberador de corticotropina también son susceptibles de desempeñar un papel en la comunicación bidireccional intestino-cerebro. Aparte de funcionar como neurotransmisores, muchos péptidos biológicamente activos también funcionan como hormonas intestinales (18) (Fig. 11).

Dado que los neuropéptidos y las hormonas intestinales se dirigen a los mismos receptores de membrana celular

(típicamente receptores acoplados a la proteína G), las dos funciones de mensajero convergen a menudo en las mismas implicaciones biológicas o similares. Esto está ejemplificado por NPY y el péptido YY (PYY), dos miembros de la familia de péptidos PP-veces. La función de las células enteroendocrinas liberadoras de PYY está directamente influenciada por los ácidos grasos de cadena corta generados por la microbiota intestinal a partir de la fibra indigestible, mientras que el NPY puede controlar el impacto de la microbiota intestinal sobre los procesos inflamatorios, el dolor, la función cerebral y el comportamiento.

La microbiota generando, como veremos a continuación, las sustancias citadas no solo modifica la actividad bioquímica del huésped sino que además y en reciprocidad utiliza moléculas producidas por las células del huésped, un ejemplo de mutualismo.

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO Y SISTEMA ENDOCRINO

Los neuropéptidos son mediadores importantes tanto dentro del sistema nervioso como entre las neuronas y otros tipos de células como las endocrinas en el tracto gastrointestinal y otros órganos endocrinológicamente activos. Los neuropéptidos tales como la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el neuropéptido Y (NPY), el polipéptido intestinal vasoactivo, la somatostatina y el factor liberador de corticotropina también son susceptibles de desempeñar un papel en la comunicación bidireccional intestino-cerebro. Con esta capacidad pueden influir en la actividad de la microbiota gastrointestinal y su interacción con el eje intestino-cerebral. Aparte de funcionar como neurotransmisores, muchos péptidos biológicamente activos también funcionan como hormonas intestinales.

Fig. 11.

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO Y METABOLITOS MICROBIANOS

La capacidad de la microbiota para influir en el comportamiento de los mamíferos por una vía independiente a la del sistema inmunitario se relaciona por su capacidad para sintetizar y/o reconocer sustancias iguales o análogas a las producidas por el sistema nervioso del huésped (19).

Aunque no se ha podido demostrar que la microbiota, tanto procariota como eucariota, pueda sintetizar sustancias análogas a neuropéptidos, sí que se sabe que son capaces de generar neurotransmisores y neuromoduladores (20). Las especies de los géneros *Candida*, *Escherichia*, *Streptococcus*, y *Enterococcus* sintetizan 5-hidroxitriptamina (5-HT), las de los géneros *Escherichia*, *Bacillus* y *Saccharomyces* generan dopamina y / o noradrenalina, los miembros del género *Lactobacillus* producen acetilcolina y los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* fabrican ácido gamma-aminobutírico (GABA) (21-24) (Fig. 12). Se ha descrito que la liberación por la microbiota de derivados de la dopamina en el lumen del intestino puede modificar los receptores opioides y cannabinoides, ya que determinados probióticos alteran su expresión en el intestino. Además la microbiota es capaz de producir dopamina y norepinefrina, hormonas

neuroendocrinas biológicamente activas y en cantidades suficientes para afectar la neurofisiología del huésped (23)

Como hemos visto anteriormente la producción de péptidos producidos por las células enteroendocrinas pudiera ser la respuesta a los metabolitos generados por la microbiota y por tanto este proceso resulta en su actuación como transmisores bidireccionales en la comunicación intestino-cerebro tanto en las vías aferentes, centrales y eferentes. Además, las células microbianas responden específicamente a los neuromediadores / neurohormonas producidos por el huésped. Ambos mecanismos confirman una adaptación de tipo mutualista que se ha desarrollado durante millones de años de coevolución conjunta. Podríamos decir que las moléculas implicadas forman parte de un "lenguaje" neuroquímico universal que algunos investigadores denominan "endocrinología microbiana" (25-27) entendiéndolo como tal la intersección de los campos de la microbiología y la neurofisiología y que se inició con la demostración de que neurotransmisores y otras moléculas como las drogas psicoactivas que influyen en las neuronas y producidos por el huésped durante el estrés, como la norepinefrina, aumentan dramáticamente el crecimiento bacteriano tanto in vitro e in vivo (Para la revisión véase 28).

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO Y METABOLITOS MICROBIANOS

Especies de los géneros *Candida*, *Streptococcus*, *Escherichia* y *Enterococcus* sintetizan 5-hidroxitriptamina (5-HT), de los géneros *Escherichia*, *Bacillus* y *Saccharomyces* generan dopamina y / o noradrenalina, los del género *Lactobacillus* producen acetilcolina y los de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* fabrican ácido gamma-aminobutírico (GABA).

La liberación por la microbiota de derivados de la dopamina en el lumen del intestino puede modificar los receptores opioides y cannabinoides ya que determinados probióticos alteran su expresión en el intestino. Además la microbiota es capaz de producir dopamina y norepinefrina, hormonas endocrinas activas y en cantidades suficientes para afectar la neurofisiología del huésped (Asano et al. 2012)

Esta información sugiere que la microbiota intestinal es una fuente rica de compuestos aún no identificados con potencial terapéutico.

Fig. 12

ESTUDIO DEL EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO MEDIANTE IMÁGENES CEREBRALES

Como hemos visto todo indica que la implicación de la microbiota sobre el cerebro es importante, sin embargo hay que reconocer las dificultades para descifrar los vínculos directos reales entre ésta y la función cerebral. Tillisch y colaboradores en el 2013 (29) relacionaron imágenes cerebrales obtenidas por resonancia nuclear con la medida de los niveles de emoción en función de la composición de la microbiota en poblaciones humanas. Sus resultados fueron reveladores ya que encontraron que la ingestión de probióticos afecta las funciones cerebrales que procesan las regiones del cerebro que controlan la emoción y la sensación (Fig. 13). Actualmente las investigaciones en el campo de la imagen cerebral se realizan acoplado la

ecología microbiana del intestino con redes cerebrales a gran escala (30). Esta aproximación debe ayudarnos a determinar cómo el microbioma influye en la función cerebral, e incluso identificar mediadores del eje intestino-cerebro. Hoy tenemos la gran suerte en esta mesa redonda de contar a continuación con nuestro compañero académico Sebastian Cerdán, que nos va a presentar los resultados obtenidos utilizando técnicas de imagen y espectroscopía de resonancia magnética que permiten visualizar las estructuras cerebrales activadas por los productos de la microbiota.

Pero antes de terminar permítanme unas palabras sobre el futuro de los estudios sobre el eje microbiota-intestino-cerebro y los desafíos a que se encuentra desde el punto de vista de la investigación.

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO E IMÁGENES CEREBRALES

Tillisch y colaboradores en el 2013 relacionaron **imágenes cerebrales obtenidas por resonancia magnética** con la medida de los niveles de emoción en función de la composición de la microbiota en poblaciones humanas. Sus resultados fueron reveladores ya que encontraron que la ingestión de probióticos afecta las funciones cerebrales que procesan las regiones del cerebro que controlan la emoción y la sensación. Actualmente la investigación en el campo de la imagen cerebral se realiza acoplado la ecología microbiana del intestino (Saulnier et al., 2011) con redes cerebrales a gran escala (Irimia y Van Horn, 2013). Esta aproximación debe ayudarnos a determinar cómo el microbioma influye en la función cerebral e incluso identificar mediadores del eje intestino-cerebro.

Fig. 13

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO: HOY Y EL FUTURO

La información descrita más arriba intenta contestar como la microbiota puede tener efectos sobre los mecanismos conscientes e inconscientes de la mente. Hoy se barajan tres posibilidades: La primera a través del sistema inmunitario intestinal, el cual a su vez modula el

sistema nervioso central, la segunda a través de la producción de neuropépticos, y la tercera a través de metabolitos microbianos que difunden por los tejidos a través del sistema sanguíneo. Según algunos autores la conexión importante se produciría por el nervio vago pero también por el sistema nervioso autónomo. Debemos esperar trabajos futuros para definir la ruta o rutas

preferentes o quizás vías desconocidas actualmente y que se descubran en el futuro. Es importante conocer de inmediato estas rutas, dada su transcendencia, a fin de poder solucionar los problemas neurológicos actuales. Para terminar señalar que entre los aspectos que requieren atención inmediata se encuentran: 1) Identificación de una o más moléculas sintetizadas por microorganismos específicos como responsable del efecto detectado y confirmar la unión de la molécula o moléculas

identificadas al receptor específico bien dentro o fuera del intestino. 2) Necesitamos conocer mejor las cascadas de señalización en entornos naturales, clínicos y experimentales. Y 3) necesitamos, dado que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han sido hechos con roedores, ampliarlos a humanos para poder confirmar si los probióticos, aquellos que llamamos psicobióticos, tiene el efecto deseado sobre la salud mental (31) (Figura 14).

EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO

Aspectos que requieren atención inmediata

- 1) identificación de **una o más moléculas sintetizadas por microorganismos específicos** como responsable del efecto detectado y confirmar la unión de la molécula o moléculas identificadas al receptor específico bien dentro o fuera del intestino.
- 2) Necesitamos conocer mejor, gracias a la ayuda de la metabolómica, **las cascadas de señalización en entornos naturales, clínicos y experimentales.**
- 3) Necesitamos, dado que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han sido hechos con roedores, **ampliarlos a humanos** para poder confirmar si los probióticos, aquellos que llamamos psicobiótico tiene efectivamente el efecto deseado sobre la salud mental (Dinan et al.,)

Fig. 14

Finalmente permítanme ahora presentarles unas conclusiones del trabajo expuesto:

1. Las bacterias han colonizado al *Homo sapiens* como parásitos (provocando la enfermedad y la muerte) y también como mutualistas (microbioma). 2. Como mutualistas el microbioma se utiliza como marcador de enfermedades específicas y se propone la existencia de un eje microbiota-intestino-cerebro cuyo funcionamiento incorrecto es responsable de trastornos cerebrales: comportamiento, ansiedad, depresión, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer,...

3. Entre los posibles intermediarios que conectan el intestino con el cerebro se encuentran el sistema inmunitario, neuropéptidos y metabolitos microbianos. La

conexión con el cerebro puede canalizarse por el nervio vago, pero también por el sistema nervioso autónomo [Figura 15, modificada de Muy Interesante 426, 66-70 (2016)].

4. Se han obtenido imágenes cerebrales en humanos que relacionan la composición de la microbiota con la emoción.

5. Necesitamos que los estudios realizados con roedores se amplíen a humanos para poder confirmar que los probióticos tiene efecto sobre la salud mental.

6. El microbioma forma parte de un ecosistema mutualista necesario al *Homo sapiens* para que pueda sobrevivir como especie.

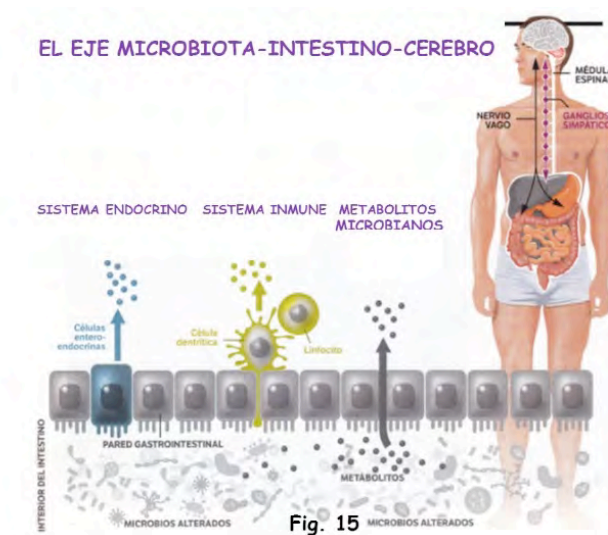


Fig. 15

CONCLUSIONES

1. Las bacterias han colonizado al *Homo sapiens* como **parásitos** (provocando la enfermedad y la muerte) y también como **mutualistas (microbioma)**.
2. El **microbioma** se usa como **marcador** de enfermedades específicas y se propone la existencia de un eje **microbiota-intestino-cerebro** cuyo funcionamiento incorrecto es responsable de trastornos cerebrales: comportamiento, ansiedad, depresión, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer...
3. Entre los posibles intermediarios que conectan el intestino con el cerebro se encuentran el **sistema inmune, sistema endocrino y metabolitos microbianos**. La conexión con el cerebro puede canalizarse por el **nervio vago** pero también por el **sistema nervioso autónomo**.
4. Se han obtenido imágenes cerebrales en humanos que relacionan la composición de la **microbiota con la emoción**.
5. Necesitamos que los estudios realizados con roedores se amplíen a humanos para poder confirmar que los **probióticos** tiene efecto sobre la salud mental.
6. El **microbioma forma parte de un ecosistema mutualista necesario al *Homo sapiens* para que pueda sobrevivir como especie.**



Fig. 16

REFERENCIAS

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-8.
2. Woese CR, Fox GE. The concept of cellular evolution. *J Mol Evol* 1977; 20: 1-6.
3. Lederberg J. Infectious history. *Science* 2000; 288: 287-93.
4. Mayer EA, Tillisch K. The brain-gut axis in abdominal pain syndromes. *Annu Rev Med* 2011; 62: 381-96.
5. Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014; 146: 1500-12.
6. Yau PL, Castro MG, Tagani, A, Tsui, WH, Convit A. Obesity and metabolic syndrome and functional and structural brain impairments in adolescence. *Pediatrics* 130, e856-864 (2012).
7. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701-12.
8. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R, Rudi K. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 1155-62.
9. Jiang J, Liu F, Wan X, Jiang C. Perception of Melodic Contour and Intonation in Autism Spectrum Disorder: Evidence from Mandarin Speakers. *J Autism Dev Disord* 2015; 45: 2067-75.
10. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* 2015; 125: 926-38.
11. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015; 30: 350-8.
12. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701-12.
13. Lyte M, Cryan JF. Dealing with ability of the microbiota to influence the brain, and ultimately cognition and behavioral. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: ix-xi.
14. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; 6: 869-77.
15. Sankar A, MacKenzie RN, Foster JA. Loss of class I MHC function alters behavior and stress reactivity. *J Neuroimmunol* 2012; 244: 8-15.
16. Rilett KC, Friedel M, Ellegood J, MacKenzie RN, Lerch JP, Foster JA. Loss of T cells influences sex differences in behavior and brain structure. *Brain Behav Immun* 2015; 46: 249-60.
17. De León-Nava MA, Nava K, Soldevila G, López-Griego L, Chávez-Ríos JR, Vargas-Villavicencio JA, Morales-Montor J. Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 113: 57-64.
18. Holzer P, Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: 195-219.
19. Lyte M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003726.
20. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012; 336: 1262-67.
21. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays* 2011; 33: 574-81.
22. Forsythe P, Kunz WA. Voices from within: gut microbes and the CNS. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 55-69.
23. Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Aiba Y, Kimura T, Yoshihara K, Koga Y, Sudo N. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am J*

- Physiol Gastrointest Liver Physiol 2012; 303: G1288-G295.
24. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. Gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 411-7.
 25. Lyte M. Microbial endocrinology and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: 3-24.
 26. Lyte M. Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior. *Gut Microbes* 2014; 5: 381-9.
 27. Lyte M, Cryan JF. Dealing with ability of the microbiota to influence the brain, and ultimately cognition and behavioral. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: ix-xi.
 28. Lyte M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med Hypotheses* 2010; 74: 634-8.
 29. Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, Guyonnet D, Legrain-Raspaud S, Trotin B, Naliboff B, Mayer EA. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* 2013; 144: 1394-401.
 30. Irimia A, Van Horn JD. The structural, connectomic and network covariance of the human brain. *Neuroimage* 2013; 66: 489-99.
 31. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry* 2013; 74: 720-6.



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Reiniciada la actividad académica tras el ralenti estival de los meses de julio y agosto, en el mes de septiembre se celebró una Toma de Posesión de Académico de Honor y una jornada científica enmarcada en la "**Cátedra Pedro Guillén de Medicina Regenerativa**".

El 28 de septiembre tomó posesión como Académico de Honor el **Excmo. Sr. D. Pedro Guillén García**, Director de la Clínica CEMTRO, quien pronunció su discurso titulado: "**De la escayola al cultivo celular**". Pronunció la "laudatio" el Académico Secretario de la RANF, **Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas**.

En sus palabras señaló que el Dr. Pedro Guillén nació en Archena (Murcia) en el año 1938. Se trasladó a Madrid para cursar los estudios de Licenciatura en la Universidad Complutense de Madrid. Realizó su tesis doctoral con la calificación de Sobresaliente cum laude en la Facultad de Medicina de dicha Universidad.

Su labor académica y de profesor universitario le lleva a desempeñar distintos cargos como: Profesor funcionario del cuerpo de titulares de la Universidad. Complutense de Madrid; especialista en traumatología y ortopedia del deporte; Catedrático Extraordinario y Decano Honorario de la Universidad Católica San Antonio de Murcia; Director de varias Escuelas de Fisioterapia y Traumatología del Deporte; Associate Professor of Orthopaedics and Traumatology "Honoris Causa" por The Constantinian University, City of Cranston, State of Rhode Island, USA en 2004. Doctor Honoris Causa por la Universidad Católica de San Antonio de Murcia. Tema: Medicina, Moral y Ciencia. en 2007. Doctor Honoris Causa por la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, en 2008; Doctor Honoris Causa por la Universidad Pontificia de Salamanca, en 2015; Director y Co-director de tesis doctorales en ciencias básicas, traumatología y cirugía ortopédica y fundamentalmente sobre traumatología del deporte.

Dentro de la labor asistencial e investigadora ha ocupado los cargos de: Jefe del Servicio de Traumatología y C.O. del Centro de Rehabilitación MAPFRE-FREMAP (1972-2000); Director Médico del Centro de Rehabilitación MAPFRE-FREMAP (1979-2000); Director Nacional de los Servicios Médicos de MAPFRE-FREMAP (1979-2000); Fundador y Director de la Clínica CEMTRO desde 1998; Fundador y Presidente de la Fundación Dr. Pedro Guillén; Fundador y Director de la Unidad Internacional Investigadora Biomédica; Director del Curso Internacional de Patología de la Rodilla, anual, y celebrado ininterrumpidamente durante 33 años. Ha recibido innumerables premios y distinciones. Cabe destacar el Premio Nacional de Investigación en 1983 concedido por la Sociedad Española de Traumatología y Cirugía Ortopédica. Premio Nacional de Investigación en Medicina Deportiva, y la Medalla al Mérito del Trabajo, otorgada por el Ministerio de Trabajo e Inmigración en 2011.

Es miembro de numerosas Academias nacionales e internacionales, Académico de Honor de la Academia de Cirugía Española; Secretario General de la Academia de Cirugía de Madrid. (1985-1999). Es Académico Correspondiente de numerosas Academias, como: Real Academia de Medicina de Murcia; de la Real Academia de Medicina y Cirugía del Distrito de Cádiz; de la Real Academia Nacional de Medicina; Académico de Honor de la Academia de Ciencias Médicas de Cantabria (Medicina, Farmacia, Veterinaria y Ciencias Afines). Académico de Honor de la Academia Médico-Quirúrgica Española; de la Real Academia Nacional de Farmacia; de la Academia de Farmacia de Santa María de España; de la Academia de CC. Veterinarias de la Región de Murcia; Académico de Honor de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia;

El Dr. Pedro Guillén en su Discurso de Ingreso, trató el tema titulado: "De la escayola al cultivo celular", en el que nos explicó que la lesión del sistema músculo esquelético que siempre ha acompañado al hombre en su paso por la tierra, ha tenido distintos tratamientos y todos ellos estaban en consonancia con los avances bio-tecnológicos que existían en el momento de producirse, y expuso los métodos terapéuticos que una herida, luxación, fractura o traumatismo, recibían según los conocimientos médicos del siglo o año que sucedían, ya que la medicina es una disciplina nacida del "homo sapiens" y por todo ello ha estado unida a la evolución que la ha caracterizado, y a nuestra especie a lo largo de la historia. Una

fractura siempre fue tratada con reposo y en descarga para evitar el dolor y para que consolidara. Y así por distintos aplicaciones, como maderas o astillas vendadas, para de esta manera inmovilizar la zona lesionada. A partir de 1852, momento en el que Anthonius Mathijsen inventó el yeso, y hasta nuestros días, se considera a este procedimiento como el ideal. Pero el yeso, “la escayola”, presenta inconvenientes, como la inmovilización, que se ha ido eliminando con la *osteosíntesis*, es decir, reducir la fractura y mantenerla con tornillos, placas, clavos, y así evitar la inmovilización y la rigidez articular.

La aplicación de la *osteosíntesis* ha sido posible por los avances en asepsia, metalurgia y anestesia. Después la articulación artrósica en personas edadas ha sido sustituida por prótesis con excelentes resultados, tanto que el paciente puede hacer su vida normal, incluso deporte. ¡Que un hueso fracturado tiene que ser inmovilizado para que se una, o cure, debe ser universalmente reconocido!

Y ahora la célula como medicamento, es una oportunidad terapéutica, que bien multiplicándola, haciéndola crecer, o haciéndola cambiar de función, se ha convertido en el protagonista de la ingeniería celular, y de este modo con la Medicina Regenerativa, hoy por hoy presenta las mejores credenciales posibles para asumir el desafío que suponen reparar o reemplazar órganos o tejidos enfermos o mermados, bien por el desgaste inherente a la edad, o bien como consecuencia de una determinada patología.

La evolución biotecnológica no ha hecho más que comenzar. Y, como todas las revoluciones, resulta difícil predecir cómo acabará y qué nos deparará.

Ese mismo día se celebró la primera jornada científica enmarcada en la recién creada "**Cátedra Pedro Guillén de Medicina Regenerativa**". En esta ocasión tuvimos el honor de contar con dos científicos punteros en el panorama mundial en esta disciplina. Bajo la Presidencia y Presentación del **Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez**, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, se dio paso a las ponencias de los eminentes científicos siguientes.

El **Excmo. Sr. D. Juan Carlos Izpisúa Belmonte**, Académico de Honor de esta Real Academia Nacional de Farmacia y Doctor en Bioquímica y Farmacología, Jefe de Investigación Gene Expresion Laboratory, Salk Institute, La Jolla California (USA), quien nos ilustró acerca de la "**Regeneración Tisular, Enfermedad y Envejecimiento**".

El Dr. Izpisúa Belmonte nos resumió su amena conferencia en inglés, como sigue: The area of research is focused on the understanding of stem cell biology, organ and tissue development and regeneration. His observations include uncovering the role of some home box genes in limb patterning and specification, as well as the identification of the molecular mechanisms that determine how the different cell type precursors of internal organs are organized spatially along the embryonic body axes. During the last few years he has made seminal discoveries in the field of tissue and organ regeneration, the differentiation of human stem cells into various tissues, and the molecular basis underlying aging and somatic cell reprogramming and (epi)genetic editing. These observations may help towards the discovery of new molecules as well as specific cell based treatments for a wide variety of diseases afflicting mankind.

Aging is the major risk factor for many human diseases including organ failure. In vitro studies have demonstrated that cellular reprogramming to pluripotency reverses cellular age, but alteration of the aging process through reprogramming has not been directly demonstrated in vivo. I will report that partial reprogramming by short-term cyclic expression of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc (OSKM) ameliorates cellular and physiological hallmarks of aging, tissue and organ physiology and prolongs lifespan in a mouse model of premature aging. Similarly, expression of OSKM in vivo improves recovery from metabolic disease and muscle injury in older wild-type mice. The amelioration of age-associated phenotypes by epigenetic remodeling during cellular reprogramming highlights the role of epigenetic deregulation as a driver of mammalian aging. Recent results on how to genetically modify and reverse the aging process are explained. Establishing in vivo platforms to modulate age-associated epigenetic and genetic marks may provide further insights into the biology of aging and tissue and organ regeneration.

Seguidamente el eminente **Prof. Dr. Manuel Serrano Marugán**, Profesor ICREA, Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona), disertó sobre: "**Senescencia celular y reprogramación en respuesta al daño Tisular**".

Manuel Serrano obtuvo el Doctorado en Biología Molecular en 1991, en la Universidad Autónoma de Madrid, trabajando en el laboratorio de Margarita Salas. Entre 1992 y 1996 Serrano trabajó en el laboratorio dirigido por David Beach en el Cold Spring Harbor Laboratory (Nueva York, USA). En este período, Serrano hizo su descubrimiento más importante con la identificación y caracterización del gen p16, uno de los genes más importantes en la protección contra el cáncer. Serrano volvió a España en 1997 para dirigir un grupo de investigación, primero en el Centro Nacional de Biotecnología, y a partir de 2003 en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Desde 2010 es Director del Programa de Oncología Molecular del CNIO.

Manuel Serrano es reconocido internacionalmente como uno de los líderes en el campo de la supresión tumoral. Además del descubrimiento del gen p16, sus principales contribuciones han sido el identificar la senescencia celular como una de las principales respuestas celulares anti-cancerosas. Recientemente ha demostrado por primera vez que la senescencia celular también ocurre durante el desarrollo embrionario participando en procesos de remodelación tisular.

El grupo de Serrano fue pionero en la generación de ratones modificados genéticamente para que sean resistentes al

cáncer, y también en la conexión entre los genes protectores del cáncer y la protección contra el envejecimiento.

En los últimos años las líneas de investigación del grupo de Serrano se han ampliado al metabolismo y su relación con el envejecimiento, y a la reprogramación celular. Su grupo fue el primero en demostrar que es posible reprogramar las células dentro del organismo hasta alcanzar pluripotencia, descubrimiento que fue considerado Avance del Año 2013 por la revista *Nature Medicine*. Más recientemente han reportado en la revista *Science* (2016) que la reprogramación *in vivo* se fomenta enormemente cuando coexiste un daño tisular gracias a la producción del factor IL-6.

El daño tisular y la senescencia proporcionan señales críticas para la reprogramación celular *in vivo*. La expresión ectópica de los factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC (OSKM) permite la reprogramación de células adultas diferenciadas en células pluripotentes, conocidas como células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), que son funcionalmente equivalentes a las células madre embrionarias. La expresión de OSKM *in vivo* conduce a la desdiferenciación y reprogramación generalizada de células dentro de tejidos y, eventualmente, a la formación de teratomas (tumores que surgen de iPSCs). Los mecanismos moleculares que funcionan durante la reprogramación OSKM *in vitro* han sido ampliamente caracterizados; sin embargo, poco se sabe sobre la reprogramación *in vivo*.

El proceso de reprogramación de OSKM es ineficiente tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han identificado *in vitro* varias barreras intrínsecas de células, la mayoría de las cuales se activan por daño celular y son particularmente prominentes en las células envejecidas. Mecánicamente, estas barreras intrínsecas de las células a la reprogramación están mediadas principalmente por los supresores tumorales p53, p16INK4a y ARF (estos últimos están codificados por el locus del gen *Ink4a/Arf*). En este trabajo, investigamos el efecto que tienen sobre la reprogramación “*in vivo*” estos supresores tumorales, el daño celular, y el envejecimiento.

Como resultados, encontramos que la expresión de OSKM “*in vivo*” no sólo desencadena la reprogramación de algunas células, sino que también infringe un daño extenso en muchas otras células, lo que las lleva a un estado conocido como senescencia celular. Las células senescentes se caracterizan por su incapacidad para proliferar y por la secreción de citoquinas inflamatorias. Hemos observado una correlación positiva entre la senescencia y la reprogramación impulsada por OSKM. Por ejemplo, los tejidos que carecen de p16INK4a/ARF no experimentan senescencia, y su capacidad de reprogramar está gravemente comprometida. Por el contrario, en los tejidos que carecen de p53, el daño es desenfrenado; esto conduce a niveles máximos de senescencia, a la producción exacerbada de citoquinas y al aumento de la reprogramación “*in vivo*”. Para explorar la conexión entre senescencia y reprogramación, manipulamos estos procesos “*in vivo*” mediante intervención farmacológica. Un aumento de la senescencia producida por Palbociclib (un fármaco que imita funcionalmente p16INK4a) resulta en mayores niveles de reprogramación. Por el contrario, una reducción de la senectud lograda por Navitoclax (un fármaco proapoptótico con selectividad frente a células senescentes) conduce a una disminución de la reprogramación *in vivo*. Encontramos que la interrelación entre la senescencia y la reprogramación está mediada por el microambiente rico en citoquinas asociado con las células senescentes. Esto se basa, entre otras pruebas, en la observación de que la inhibición farmacológica de NFκB, un impulsor principal de la producción de citoquinas, reduce la reprogramación *in vivo*. El análisis de las citoquinas inflamatorias producidas por las células senescentes, tanto *in vivo* como *in vitro*, nos llevó a identificar a la interleuquina-6 (IL-6) como un factor secretado crítico responsable de la capacidad de las células senescentes para promover la reprogramación. En apoyo de esto, el bloqueo de la IL-6 o PIM, su efector de la quinasa aguas abajo, reducían potentemente la reprogramación “*in vivo*”. Estas observaciones pueden ser recapituladas *in vitro*, donde la eficiencia de reprogramación se ve fuertemente potenciada por la presencia de células dañadas o por el medio condicionado derivado de células dañadas. Además, la inmunodepleción de IL-6 del medio acondicionado abolía la reprogramación. Habiendo establecido que la senescencia promueve la reprogramación, estudiamos si la lesión del tejido que conduce a la senescencia tiene un efecto positivo en la reprogramación impulsada por OSKM.

Mostramos que el daño de tejido inducido por Bleomicina promueve fuertemente la reprogramación en el pulmón. Por último, el envejecimiento, que se asocia con mayores niveles de senescencia celular, también favorece la reprogramación impulsada por OSKM, tanto en ratones con progeria como en ratones fisiológicamente envejecidos.

En conclusión, la expresión de OSKM *in vivo* desencadena dos resultados celulares diferentes: reprogramación en una pequeña fracción de células, y daño y senescencia en muchas otras células. Existe una fuerte asociación positiva entre estos dos procesos, ya que la senescencia celular crea un contexto tisular que favorece la reprogramación impulsada por OSKM en células vecinas.

El efecto positivo de la senescencia en la reprogramación está mediado por factores secretados, de los cuales IL-6 es un jugador clave. Esto también sería aplicable a la lesión de los tejidos y el envejecimiento, donde hay una acumulación de células senescentes que envían señales a las células circundantes para promover la desdiferenciación y reprogramación conducida por OSKM. Una interacción conceptual similar puede ocurrir en condiciones fisiológicas, donde la senescencia causada por el daño podría inducir la desdiferenciación celular para promover la reparación tisular. Modelo de interacción entre la senescencia (asociada al daño tisular) y la reprogramación (que se propone como paso previo a la reparación).

Cerró la Sesión el Presidente de la Cátedra de su nombre, el **Excmo. Sr. D. Pedro Guillén García**, Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia Fundador y Director de la Clínica CEMTRO.

Entrega de medallas.

Recientemente, el pasado jueves 28 de septiembre, nuestro Académico Secretario, Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, hizo entrega a nuestro Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, de las Medallas Conmemorativas del 80 Aniversario de la Asociación de Farmacéuticos de Brasil; y de la medalla del 50 Aniversario de la creación de la Academia Nacional de Farmacia de Brasil. Ambas medallas se le habían entregado al Académico Secretario D. Bartolomé Ribas Ozonas

Este reconocimiento fue celebrado anteriormente en el marco de VIII Encuentro de Academias Iberoamericanas de Farmacia, celebrado en Paraguay el pasado mes de septiembre, al cual acudieron en representación de la RANF, nuestro Académico Secretario, Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, y nuestro Vicepresidente, Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García, este último en representación de la Academia de Farmacia de Castilla-León.

Necrología

Nuestra Real Academia ha tenido la triste noticia y pre tanto importante pérdida por el fallecimiento de nuestro amigo y compañero Académico D. Manuel Ortega Mata. La Academia expresó sus condolencias a su hijo, Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, también Académico de nuestra Institución, y a su familia, acompañándose con una corona de flores de parte de nuestra Academia. Se celebró el funeral, que estuvo abarrotado de familiares, compañeros y amigos, profesores, bedeles y personal conocido, donde se manifestó el pésame a tan admirable y encomiable persona, y brillante Académico.

Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario RANF