

ANALES
DE LA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

AÑO 2005 - TOMO CXXII

CUADERNO CUARTO

SESIONES CIENTÍFICAS



Edita: REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Depósito Legal: M. 5.020.—1958
I.S.S.N. 0034-0634

Fotocomposición e impresión: Taravilla. Mesón de Paños, 6 - 28013 Madrid

XVII SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 25 DE OCTUBRE DE 2005

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

**ASOCIACIÓN DEL DOLOR FÍSICO
Y LA DEPRESIÓN**
***ASSOCIATION BETWEEN CHRONIC PAIN
AND DEPRESSION***

Por el Excmo. Sr. D. FRANCISCO ALONSO FERNÁNDEZ

Académico de Número

**CÓRNEA ARTIFICIAL.
CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA TISULAR**
***ARTIFICIAL CORNEA,
CELL CULTURE AND TISSUE ENGINEERING***

Por el Excmo. Sr. D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ

Académico de Número

**ASOCIACIÓN DEL DOLOR FÍSICO
Y LA DEPRESIÓN**
***ASSOCIATION BETWEEN CHRONIC PAIN
AND DEPRESSION***

Por el Excmo. Sr. D. FRANCISCO ALONSO FERNÁNDEZ

Académico de Número

Resumen

La comorbilidad, integrada por el dolor físico crónico y la depresión, es muy común. Los síntomas depresivos somatomorfos toman a menudo la forma de diferentes tipos de dolor. Entre ellos sobresalen los dolores premenstruales y la fibromialgia.

El dolor crónico conduce a la depresión como consecuencia de la intervención de factores biomédicos, psicosociales (actitud pasiva, discapacidad) y farmacológicos. La actitud de enfrentarse con el dolor y aceptarlo reduce la intensidad del dolor, el grado de discapacidad y el riesgo de depresión. El uso de analgésicos debe atenerse a un plan individualizado. Varios productos antidepressivos actúan reduciendo la intensidad del dolor.

La depresión es infrarreconocida e infratratada sobre todo en pacientes con dolor crónico. Se describen siete pistas para detectar la depresión: la historia personal y familiar, el tipo de personalidad, los aspectos clínicos y evolutivos de los síntomas somatomorfos, la búsqueda de otros síntomas depresivos y los efectos terapéuticos faorables determinados por un fármaco antidepressivo.

Abstract

The comorbidity integrated by chronic pain and depression is very common. The somatoform depressive symptoms appear often as diferent types of pain. Amon them premenstrual pain and fibromialgia are some of the most important clinical pictures.

Chronic pain leads to depression as a consequence of these three kinds of factors: biomedical, psychosocial (passive attitude, disability) and phar-

macological agents. Coping and acceptance of chronic pain is associated with lower pain intensity, less depression and less psychosocial disability. The appropriate use of analgesics in the management of chronic pain demands individualization. Several antidepressants have positive effects on pain syndrom.

Depression is underrecognized and undertreated above all in patients with chronic pain. In order screening the depression seven ways are described here: personal and family history, type of the personality, clinic and evolutive aspects of somatoform symptom, search of other depressive symptoms and positive therapeutic effect determined by an antidepressant.

I. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA Y SU MAGNITUD

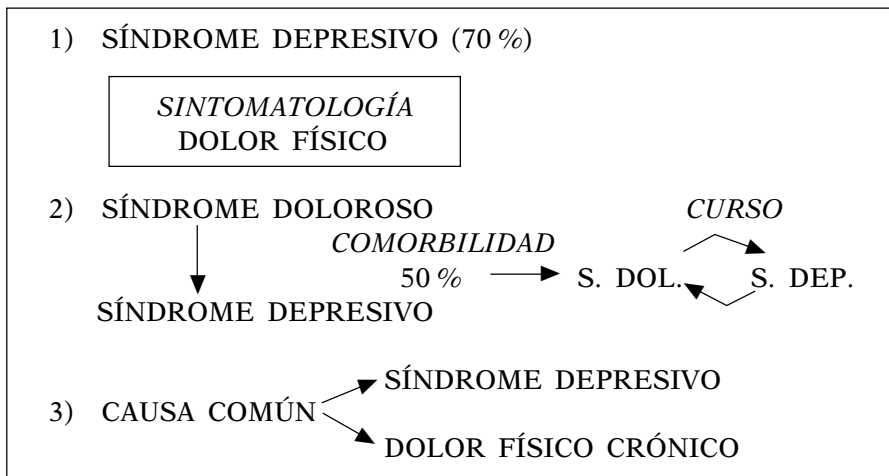
Estamos ante un tema de la más viva actualidad para los enfermos, los terapeutas y la población general.

En la perspectiva de los enfermos, la asociación del dolor físico crónico (DFC) —al cual me voy a referir por su preferente acción depresógena en tanto que el dolor agudo se vincula a la ansiedad— y el síndrome depresivo (SD) representa en muchos casos el padecimiento humano más mortificante y apocalíptico. Se suele hablar de dolor crónico o síndrome doloroso cuando el dolor ha alcanzado la duración de seis meses, sea su presencia continua o intermitente. En la óptica clínica los problemas planteados por la asociación del DFC y el SD se refieren al diagnóstico y la terapia y se extienden a interrogantes investigatorios de un interés verdaderamente apasionante.

Se conjugan dos trastornos que marcan la cultura occidental en el momento actual. El dolor porque es hoy más temido que nunca, como consecuencia de la acumulación del hedonismo narcisista que caracteriza al ser humano contemporáneo y de la falta de contacto con el sufrimiento y el malestar (lo tememos más que nunca y lo soportamos y toleramos peor que nunca porque lo experimentamos menos que nunca). En el plano de los temores colectivos, el miedo al dolor o algofobia ocupa hoy el primer lugar, por delante incluso del miedo a la muerte o tanatofobia y después de haber sepultado en el olvido a la tafiofobia o miedo a ser enterrado vivo, fenómeno epidémico masivo en siglos anteriores. Por su parte, el SD, con una prevalencia actual del 8 % y una prevalencia global o vital del 20 %, ambas referidas a la población occidental adulta y que se hallan todavía en plena curva epidemiológica ascendente, es uno de los emblemas infortunados de la cultura occidental moderna y postmo-

derna. En definitiva, no constituye ninguna exageración proclamar que nos encontramos inmersos en una Sociedad Algodófica y que atravesamos una Era Cultural Depresiva.

La asociación del SD y del DFC se sintetiza en tres modalidades (esquema 1).



ESQUEMA 1. Relaciones de causalidad entre el síndrome depresivo y el dolor físico crónico o síndrome doloroso.

El síndrome depresivo comprende en el 70 % de los casos sensaciones de dolor físico, lo que significa que el dolor físico es un síntoma común de la depresión. Por su parte, el dolor físico crónico se complica con la depresión en más del 50 % de los enfermos. Esta comorbilidad entre el DFC y el SD conduce a la formación de un círculo cibernético de potenciación recíproca, ya que el SD activa el DFC e incluso lo extiende a otras localizaciones.

Además de las dos fórmulas causales básicas, existe una tercera que se diluye un tanto en una u otra de ellas, según que el trastorno más temprano haya sido el SD o el DFC. Y si lo consigno aquí es como un recordatorio de que ambos fenómenos comparten mecanismos genéticos comunes en el sistema neuroendocrino, como la hiposerotoninergia, la exaltación glutamatérgica (en forma de hiperactividad de los receptores N-metil-D-aspartato), la tasa alta del neuropéptido P, el descenso de estrógenos en la mujer y los estados de obesidad. También cabría haber incluido una cuarta fórmula para las asociaciones por azar.

El grado de comorbidez entre el dolor y la depresión, con independencia de que el trastorno primario sea el dolor o la depresión, supera el 50 %, o sea, que su asociación es más frecuente que su presentación aislada. En las asociaciones del DFC y el SD se distinguen dos grandes grupos: en el grupo mayoritario, el 60 % de estos enfermos, el dolor es un síntoma depresivo, y en el 40 % restante, el cuadro depresivo ha hecho irrupción después del establecimiento del proceso orgánico, lo que señala al dolor como origen de la depresión (Romano y Turner, 1985).

II. LA SINTOMATOLOGÍA DOLOROSA DE LA DEPRESIÓN

La palabra *depresión* proviene del vocablo latino *deprimere* y significa hundimiento o abatimiento. Lo que se hunde en la depresión es el plano vital del ser humano. Éste es el núcleo común a todos los enfermos depresivos. El enfermo depresivo es, pues, ante todo, un enfermo de la vitalidad.

El plano vital de la persona tiene una índole mixta, psíquica y física, y comprende ciertos vectores básicos, cuyo hundimiento se refleja en la sintomatología depresiva (esquema 2). Hay depresiones completas, con una presencia de la sintomatología correspondiente a las cuatro dimensiones y depresiones incompletas, con un cuadro formado por sintomatología uni, bi o tridimensional.

Este modelo tetradimensional de la depresión, expuesto en libros míos (1988, 1996, 2001), permite entender por qué la sintomatología de la depresión se distribuye entre datos psíquicos y datos físicos funcionales, o sea por qué los síntomas somáticos forman parte del fenómeno depresivo.

VECTOR FUNCIONAL DE LA VITALIDAD	DIMENSIÓN DEPRESIVA
Estado de ánimo	► Humor depresivo
Impulsos o energía	► Anergia (falta de impulsos)
Capacidad de sintonización	► Discomunicación (ausencia de sintonización)
Regulación de los ritmos	► Ritmopatía (descontrol de los ritmos)

ESQUEMA 2. Formas de dolor físico crónico por las que puede expresarse la depresión como único síntoma (en cursiva, las más frecuentes o representativas).

Entre las cuatro dimensiones depresivas señaladas, la más vinculada de lleno al dolor físico es la del humor depresivo. La esencia del humor depresivo es una vivencia dolorosa formada por el dolor moral y el dolor físico. El dolor moral, es el dolor por vivir, el dolor vital (los alemanes hablan del *Lebensschmerz*), el dolor de la aleación de la amargura, la tristeza, el pesimismo y la desesperanza. En los cuadros depresivos habituales se impone el dolor moral y la queja del dolor físico pasa inadvertida, permaneciendo en la penumbra, como un síntoma accesorio o de acompañamiento.

**TIPOS DE DOLOR FÍSICO CRÓNICO SINTOMÁTICO
DE UNA DEPRESIÓN**

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>Migraña común</i> • <i>Cefalea tensional</i> • Facialgia • Otalgia • Glosodinia • Odontalgia • Dolor de boca • <i>Constricción en la garganta (globus faríngeo)</i> • Nucalgia • <i>Dorsalgia o escapulalgia</i> • <i>Dolor torácico</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Braquialgia • <i>Epigastralgia</i> • <i>Dolor abdominal</i> • Coxigodinia • <i>Dolor pelviano</i> • Lumbalgia • Lumbociática • Ciatalgia • <i>Fibromialgia idiopática / Polialgias difusas</i> • <i>Dolores premenstruales</i> |
|---|---|

ESQUEMA 3. Formas de dolor físico crónico por las que puede expresarse la depresión como único síntoma (en cursiva, las más frecuentes o representativas).

Pero en las depresiones larvadas en las que está presente la alteración del ánimo, el humor depresivo es representado habitualmente por un dolor somático, que constituye muchas veces, a primera vista al menos, el único síntoma depresivo. Los psiquiatras alemanes clásicos valoraban estos dolores físicos depresivos como sentimientos corporales, o sea *Leibgeföhle* (esquema 3).

He aquí las modalidades de DFC más importantes que pueden aparecer como un trastorno depresivo aislado o solitario:

1.º Los accesos de migraña común, o sea la migraña sin aura. Estos episodios dolorosos hemicraneales constituyen en muchas ocasiones la manifestación única o casi única de una depresión breve recurrente (Glover, Jarman y Sandler, 1993). En cambio, la clásica cefalea migrañosa (con aura neurológica) es una entidad nosológica

independiente, y si se asocia con frecuencia a la depresión, se debe a compartir factores de riesgo comunes (Schwartz, Prat, Armenian *et al.*, 2000). Hoy es evidente que uno de los factores de riesgo compartidos entre ambas afecciones es la hiposerotoninergia.

2.º La cefalea músculo-tensiva crónica es la cefalea inducida por la espasticidad muscular local, una de las modalidades de cefalea más extendida en el mundo, por lo común acompañada de parestasias en la cabeza y molestias en la nuca. Su cita es omitida a menudo en los tratados sobre los dolores de cabeza.

3.º La constricción en la garganta o globus faríngeo es una sensación muy desagradable vivida como una sensación de nudo asfixiante. Como los demás tipos de dolor que aquí estamos describiendo no se debe a una anomalía orgánica, si bien hay disfunciones orgánicas faringoesofágicas que producen un malestar semejante.

4.º El dolor de espalda, registrado como escapulalgia o en forma más difusa, constituye con cierta frecuencia el signo de malestar dominante o único que conduce al enfermo depresivo a una consulta médica.

5.º Los tipos de dolor torácico prevalentes en los depresivos se concentran en la región precordial o en la retroesternal en forma de una opresión dolorosa sorda o de una molestia desgarradora o lancinante; en cualquier caso, una especie dolorosa muy difícil de distinguir del malestar ocasionado por una enfermedad coronaria.

6.º Entre los dolores abdominales propios del espectro depresivo sobresalen la constricción lancinante localizada en el epigastrio y la molestia dolorosa propia del intestino irritable. Por una parte, el dolor en la boca del estómago es uno de los malestares dolorosos depresivos más mortificante. Por otra, el llamado síndrome del intestino irritable comprende una constelación de síntomas agrupados en torno al dolor abdominal crónico un tanto difuso y los hábitos intestinales alterados.

7.º Los dolores pelvianos de estirpe depresiva, localizados en el sector caudal del tronco, tienen la particularidad de ser casi exclusivos de la población femenina. Pero en este tipo de dolor, la depresión es más veces una consecuencia del sufrimiento persistente que una causa suya (Scolumb, Kellner, Rosenfeld y Pathak, 1989).

8.º Dentro de las polialgias difusas, o sea del fenómeno doloroso múltiple crónico vinculado a la depresión, se alza como la entidad más sólida la fibromialgia idiopática. Si bien su tradición se remonta a los cuadros clásicos de la neurastenia y del reumatismo nervio-

so, ha surgido en las últimas décadas como un proceso emergente con una incidencia masiva ajustada al 2 % de la población en los países muy evolucionados. Tal distribución epidemiológica unida a una tendencia al incremento progresivo, hace que se la considere como una «nueva» patología propia de la era industrial. Afecta con un notable predominio a la población femenina. Para el cuerpo médico, constituye un «cajón de sastre» (Sordet-Guepet, 2004). La OMS considera a esta figura patológica como un reumatismo no específico. Dentro de la psiquiatría existe fundamento clínico para definir este trastorno, que por cierto no es una enfermedad ni un síndrome, sino un complejo sintomatológico, como un cuadro adscrito al distrito nosológico de la depresión, siempre que no se trate de un proceso poli-miálgico inflamatorio o tóxico. Las algias espontáneas propias de la fibromialgia son difusas, localizándose con preferencia en la nuca, la región cervical, la espalda, los codos y las rodillas, y se extienden sus molestias en forma de disestesias (hormigueos) a las extremidades. En la exploración suelen detectarse dos anomalías importantes como respuesta a la presión de ciertos músculos o tendones: la hiperalgesia (sensación dolorosa exagerada provocada por un estímulo nociceptivo) y la alodinia (sensación dolorosa provocada por un estímulo no algógeno). La hiperalgesia y la alodinia son la expresión de una hipersensibilidad dolorosa de los músculos y los tendones a la presión. Las algias espontáneas difusas de la fibromialgia suelen acompañarse de astenia y trastornos del sueño, y la intensidad del dolor se incrementa con la actividad, aunque el reposo no aporta casi nunca un gran alivio. Con frecuencia se combina la fibromialgia con el síndrome de la fatiga crónica, cuadro mixto justamente denominado síndrome del cansancio doloroso crónico. Hasta los médicos organicistas más recalcitrantes no dejan de reconocer que la alta efectividad terapéutica obtenida con ciertos medicamentos antidepressivos (amitriptilina, fluoxetina y paroxetina), potenciada con el ejercicio físico progresivo, es una prueba de su vínculo etiológico con la enfermedad depresiva.

9.º Los dolores premenstruales concentrados en la región pelviana y en las fosas ilíacas, a veces extendidos a otros segmentos corporales, constituyen la mayor parte de las veces la expresión de una depresión breve recurrente. Los autores estadounidenses han comenzado a llamar a este trastorno disforia premenstrual. Muchos médicos, sobre todo masculinos, siguen considerando a este trastorno periódico como un fenómeno psicológico adscrito a la naturaleza de

la mujer que no debe tratarse. Una postura, en mi opinión, profundamente equivocada que se alimenta, a la vez, de la frivolidad clínica (la mujer que se aguante) y de la altanería del género masculino (incapacidad para ponerse en la piel de la enferma).

La detección de la depresión en estos cuadros depresivos larvados que se expresan de un modo único o casi único por un dolor somático, exige a menudo contar con una base diagnóstica negativa y otra positiva. La base negativa consiste en el criterio excluyente de una patología orgánica, responsable del dolor, en forma de un proceso somático con suficiente entidad y características adecuadas para constituir la causa del DFC.

Algunas veces la base diagnóstica positiva de depresión puede ser tan evidente que puede formularse el diagnóstico sin precisarse siquiera la exclusión previa de un proceso orgánico. Para la detección de la depresión en un cuadro somatomorfo oscuro de etiología no precisada, se dispone de varias pistas (esquema 4).

**PISTAS PARA LA DETECCIÓN DE LA DEPRESIÓN EN ENFERMOS
AFECTOS DE DOLOR FÍSICO CON O SIN BASE ORGÁNICA
CONOCIDA**

1. Antecedentes familiares de trastorno bipolar en pacientes de primer grado.
2. Antecedentes personales de depresión.
3. Perfil de personalidad especialmente predisuesto a una enfermedad depresiva:
 - Depresión endógena — Personalidad ciclotímica.
 - Depresión situativa — Personalidad obsesiva.
 - Depresión neurótica — Personalidad neurótica.
(Organización límite y personalidad alexitímica).
4. Características de la sintomatología somática crónica.
5. Ciertos rasgos evolutivos de la sintomatología somática crónica.
6. Presencia de síntomas depresivos larvados o de trasfondo.
7. Reacción terapéutica favorable a la administración de psicofármacos antidepresivos.

ESQUEMA 4. Datos útiles para la detección de la depresión ante un enfermo afectado por un dolor físico crónico continuo e intermitente.

Los apartados 1 y 2 recuerdan la necesidad de realizar una historia clínica detallada.

El apartado 3 puntualiza la existencia de una fuerte correlación positiva entre el perfil de personalidad y la categoría de enfermedad

depresiva y concluye con la mención de la organización límite de personalidad, que guarda una correspondencia inespecífica con todas las categorías de depresión, y la personalidad alexitímica que ofrece el terreno individual más propicio para que la depresión adopte la figura de un trastorno larvado somatomorfo.

El tránsito por la pista 4.^a consiste en analizar los aspectos vivenciales y conductuales del dolor sin base orgánica. Los síntomas somáticos depresivos se caracterizan por ejercer un aplastante dominio sobre el enfermo convirtiéndole en una persona sobredependiente del síntoma, lo que se expresa por estos dos datos: el sufrimiento exagerado asociado con una actitud de temor hipocondríaco, lo que se refleja en quejas desproporcionadas con respecto a la patología existente, en cuanto datos del mundo interno del enfermo; y el exagerado desplome conductual en forma de abandono de la actividad social y la tendencia al absentismo laboral, como datos externos. Ya instalado en este tobogán, el campo del pensamiento del enfermo depresivo puede ser invadido por el deseo de morir y hasta por la ideación suicida.

El apartado 5 se hace cargo de los rasgos evolutivos: los síntomas depresivos de esta estirpe se perfilan como un ritmo circadiano de empeoramiento matinal y alivio vespertino o de sometimiento a múltiples fluctuaciones un tanto caprichosas. En el ritmo estacional lo más típico es el empeoramiento en el tránsito del otoño al invierno y en el comienzo de la primavera. Los síntomas depresivos, como los reumatoides, suelen acusar con un empeoramiento los bruscos cambios climatológicos. En las mujeres, el incremento de la sintomatología en los cuatro o cinco días premenstruales es un indicio de depresión muy significativo.

El apartado 6 nos recuerda que, en contra de las apariencias, el dolor somático no es casi nunca el único síntoma depresivo, sino que sirve de tapadera a otros síntomas de carácter larvado ligero o que permanecen ocultos en el trasfondo del cuadro clínico. El descubrimiento de estos síntomas livianos o encubiertos sólo es accesible a la práctica de una entrevista minuciosa realizada con suma habilidad y complementada con la aplicación de una prueba psicométrica específica para la detección o el diagnóstico de depresión. La prueba por mí diseñada ofrece la ventaja de estar distribuida en cuatro canales interdependientes.

El punto señalado en el apartado 7 consiste en la reacción terapéutica favorable a la administración de algún producto antidepresi-

vo. Procedimiento diagnóstico definido como diagnóstico *ex iuvantibus*. Su significado diagnóstico queda aquí un tanto recortado por el hecho de que algunos fármacos antidepressivos ejercen a la vez una acción antiálgica. A despecho de esta limitación, la modificación terapéutica favorable obtenida con la administración de un fármaco antidepressivo, alcanza por lo general un valor demostrativo evidente para el diagnóstico de depresión, ya que la mejoría del dolor físico entonces alcanzada suele acompañarse de una transformación positiva del estado mental y de la conducta. Tamaña transformación liberadora en los planos mental y conductual patentiza la existencia previa de una rígida atadura depresiva que tal vez había pasado inadvertida.

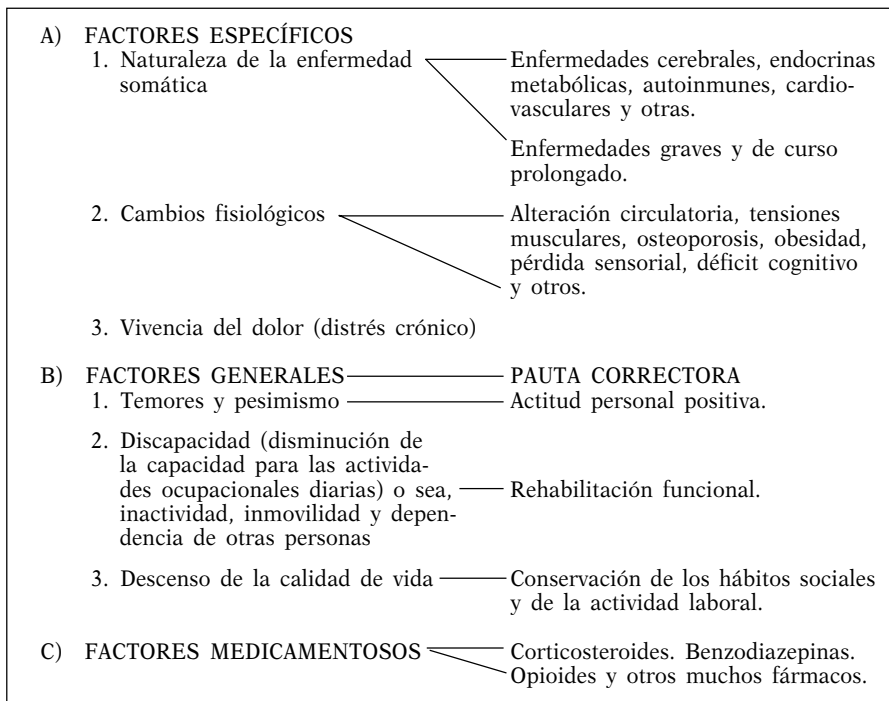
III. EL DOLOR FÍSICO CRÓNICO (DFC) COMPLICADO CON UN SÍNDROME DEPRESIVO (SD)

La particular disposición del DFC a complicarse con un SD parte de su propia naturaleza emocional. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (1979) adoptó esta definición: «Una sensación desagradable y una experiencia emocional, asociada con un daño de tejidos potencial o actual». Es importante subrayar que el dolor posee la categoría de un fenómeno de conciencia (subjetivo) del tipo de la percepción emocional que obedece a un mecanismo fisiológico procesado en el sistema límbico. Es tal su carga de emotividad que en las ciencias psíquicas suele catalogarse el dolor como un sentimiento sensorial localizado y de matiz displacentero y no como una sensación o percepción emocional. No vamos a entrar aquí en este debate. Lo innegable es que constituye un estado emocional negativo, lo que nos permite comprender cómo se refuerza con todo tipo de emociones negativas y viceversa. Éste es el círculo negativo formado por el DFC y el SD, enlazados en forma de una interacción recíproca. Lo contrario ocurre con las emociones positivas: una emoción positiva disminuye la experiencia del dolor y viceversa. También influyen sobre el dolor los factores cognitivos y conductuales.

En torno al 50 % de enfermos con dolor crónico sufre de un estado depresivo. La depresión es más común en pacientes crónicos sobrecargados de dolor que en otros sectores de pacientes crónicos (Christo, Grabow y Raja, 2004). Resulta innegable que el DFC conduce con mucha frecuencia a la depresión. Es tal esta afinidad, que

en la bibliografía actual se maneja muchas veces el DFC como uno de los factores predictores de depresión más fuertes. Puede afirmarse que el DFC es una de las antesalas del SD más concurrida.

El SD determinado o condicionado por el DFC aparece como una depresión enmascarada por el propio dolor y su sintomatología de solapamiento depresiforme formada por el pesimismo, la astenia o falta de energías, el aislamiento (el dolor se vive con una sensación de desamparo y distanciamiento de los demás) y el trastorno del apetito y del sueño. Una vez aparecida la depresión, se acrecienta el grado de dolor habitual, e incluso pueden sobrevenir dolores de otro tipo o en una localización diferente. Consiguientemente, se exacerbaban los temores y el pesimismo, se acentúa el nivel de discapacidad y se deteriora más la calidad de vida. Para el cribado (*screening*) de la depresión en un enfermo afecto de DFC valen las mismas pistas señaladas para la detección y el diagnóstico de la depresión en un enfermo aquejado de un dolor somático sin base orgánica conocida (esquema 4).



ESQUEMA 5. Factores de riesgo para la depresión propios del síndrome doloroso crónico.

El DFC acumula varios factores de riesgo para la depresión (esquema 5). Un sector de ellos comparte el rasgo específico o especial adscrito a la naturaleza de la enfermedad somática, a la vivencia del dolor o a los mecanismos biológicos implicados, todos ellos factores inevitables.

Aquí nos interesa más poner el énfasis en los factores depresógenos inespecíficos o generales implicados en el DFC, puesto que en una amplia medida son susceptibles de prevención. La toma de medidas en este sentido no sólo aleja el riesgo de depresión, sino que son pautas útiles para el manejo del propio DFC, incluso para amortiguarlo.

La pauta general antidepresiva clave, de la que se derivan en una amplia medida las demás pautas, es la adopción de una actitud mental activa, de afrontamiento del dolor (aceptación o superación según los casos), presidida por el optimismo con un cortejo de esperanzas e ilusiones y reflejada en el esfuerzo por mantener en lo posible los mismos hábitos de vida activa, sociales y laborales, actitud montada sobre una información realista.

Una actitud personal de este tipo representa la plataforma idónea para la rehabilitación funcional y para la preservación de la calidad de vida. Por ello, propugno que el tratamiento habitual del DFC debe acompañarse sistemáticamente de una intervención psicoterapéutica. Una gran parte de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad fundamental y para la reducción del DFC incrementan el riesgo de depresión. En la clínica médica general no se valora muchas veces este efecto colateral depresógeno de los medicamentos. Aunque aquí sólo voy a referirme a los productos antiálgicos, no puedo dejar de consignar la fuerte acción depresógena ejercida por los corticosteroides. Tanto es así que una de las líneas de investigación de muchos medicamentos antidepresivos se perfila como el descubrimiento de antagonistas de los corticosteroides.

Puede causar sorpresa la presencia de las benzodiazepinas entre los fármacos depresógenos, cuando algunos terapeutas no muy experimentados las utilizan como productos antidepresivos. Las benzodiazepinas son muy depresógenas en personas que han superado los 40 años.

El riesgo mayor de los opioides, muy superior a la provocación de depresión, ya que además al suprimir el dolor alejan el riesgo de depresión, es determinar una adicción, una complicación importante que no debe confundirse con la dependencia terapéutica y que implica un fuerte riesgo depresivo.

La administración repetida de un opioide para neutralizar el dolor crónico se combina por lo común con una dependencia terapéutica, lo mismo que ocurre con el empleo de los productos anti-diabéticos en los enfermos diabéticos y de los tónicos cardíacos en los cardiopatas. Esta dependencia terapéutica obedece a la dinámica entre el dolor y su supresión o alivio por el medicamento y no es un fenómeno adictivo, por lo que podría hablarse en todo caso de pseudo adicción. El uso de medicamentos opioides sólo es previsible que se complique con una verdadera adicción en los individuos que cuentan o con el antecedente de otras adicciones químicas o con una patología personal importante. De todos modos, el uso prolongado de opioides exige una vigilancia continua sobre la posible aparición de signos de adicción o de dependencia adictiva, atendiendo sobre todo a los tres datos siguientes: el ansia ardiente por el medicamento al estilo de lo que los anglosajones llaman «craving», la respuesta eufórica a su administración y la insinuación de una tolerancia que obligue al aumento progresivo de la dosis.

La administración de opioides es la terapia más usada para combatir el dolor de los enfermos cancerosos y tiende a extenderse a toda clase de dolores nociceptivos crónicos, respetando la contraindicación de los enfermos con un fuerte riesgo adictivo y además la exclusión del dolor neuropático, menos sensible a los opioides, pero no del todo resistente. Está siendo debatido si los opioides deben usarse o no durante un período superior a varias semanas para reducir el dolor nociceptivo crónico no maligno. En cualquier caso, «el apropiado uso de los opioides en el manejo del dolor crónico debe ser individualizado» (Christo, Grabow y Raja, 2004). Se dispone de estudios sobre la terapia opioide acreditativos de que el desarrollo de problemas adictivos con esta medicación sólo se produce en personas con una historia de consumo abusivo de drogas.

Entre los opioides se destaca la metadona como el único producto de esta estirpe farmacológica que combate el dolor no sólo mediante la activación de los receptores opioides (agonista opioide), sino por provocar la inhibición del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (antagonista glutamatérgico). En virtud de esta acción mixta, la metadona posee mayor efectividad que los demás opioides en el manejo del dolor nociceptivo, incluso en presencia de un contexto personal adictivo, y en la reducción del dolor neuropático, postura mantenida hoy por muchos terapeutas especializados en el tratamiento del dolor (Clark y Treisman, 2004). Además implica un

cierto efecto antidepresivo que obedece a la acción farmacodinámica inhibitoria del receptor glutamatérgico señalado.

La buprenorfina compite hoy con la metadona como medicación idónea para el tratamiento de mantenimiento del enfermo doloroso crónico. Podría ofrecer varias ventajas: la administración en días alternos, la efectividad más segura, el síndrome de abstinencia más leve y el efecto antidepresivo más intenso.

Para incrementar la potencia analgésica de los opioides ante el dolor intratable, reducir sus riesgos de adicción y depresión y en general los efectos tóxicos, y permitir además el uso de dosis más bajas, los expertos recomiendan la asociación del opioide con un producto sinérgico (esquema 6).

<i>SUSTANCIA SINERGISTA</i>	<i>RESULTADO ANTIÁLGICO</i>	<i>RIESGO DE DEPRESIÓN</i>
Naloxona (antagonista opioide)	Positivo	Inexistente
Clonidina (agonista $\alpha 2$ -adrenérgico)	Positivo	Elevado
Nimodipina (bloqueante del canal cálcico)	Dudoso	Moderado
Ketamina (antagonista del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato)	Positivo	Acción antidepresiva (efectos psicotizantes)

ESQUEMA 6. Moléculas recomendadas por los expertos para asociar con los productos opioides en el tratamiento del dolor.

Está comprobado que la baja dosis de un antagonista opioide como la naloxona actúa incrementando la acción analgésica del opioide (morfina, pentazocina, etc.). La naloxona no sólo incrementa la potencia del opioide sino que disminuye sus efectos secundarios (náuseas, vómitos, prurito), permite utilizar dosis más bajas y aleja el riesgo de la aparición de la tolerancia. Hay estudios recientes que apuntan la evidencia de que una pequeña dosis de este antagonista opioide asociada con un opioide refuerza la acción analgésica y permite disminuir su dosis (Christo, Grabow y Raja, 2004).

Los mecanismos por los que un medicamento puede producir depresión pueden ser centrales o periféricos:

- Mecanismos centrales: inhibición del sistema hipotálamo-hipófisis-tiroides; activación del sistema hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal; inhibición del sistema serotoninérgico, noradrenérgico o dopaminérgico; activación de los sistemas opioide o glutamatérgico; actuación sobre el segundo mensajero (así, por ej., el interferón α

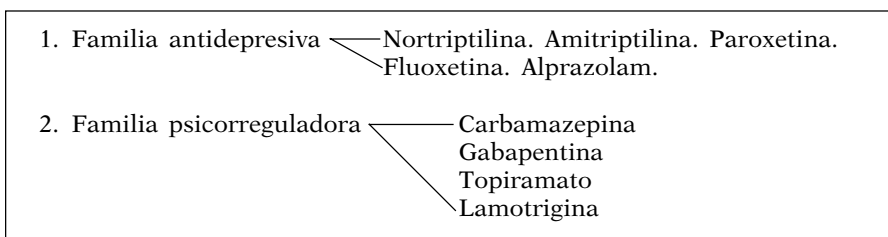
induce la producción de interleucina 1 que ejerce efectos tóxicos sobre el hipotálamo).

- Mecanismos periféricos: deshidratación, descenso de la tensión arterial, insuficiencia respiratoria, pérdida de sodio, estimulación vagal.

Los antagonistas del subtipo de receptor para el glutamato N-metil-D-aspartato tipo ketamina, despliegan una acción analgésica, incluso en casos de dolor neuropático, no sensible a los opioides, y a la vez poseen una acción antidepresiva (es conocido hoy que algunos medicamentos antidepresivos son antagonistas de este receptor). Su mayor inconveniente es la determinación de efectos psicotizantes positivos (tipo alucinaciones y delirio) y negativos (tipo introversión autística).

El antagonismo con el receptor N-metil-D-aspartato para el glutamato compartido por algunas sustancias antiálgicas y antidepresivas, parece ser la clave de la acción clínica entrecruzada entre ambas especies de moléculas. Y aquí puede residir el remedio futuro para la asociación del DFC y el SD: la combinación adecuada de analgésicos con un efecto antidepresivo y de antidepresivos con un efecto analgésico.

El arsenal terapéutico antiálgico se ha enriquecido notablemente en los últimos tiempos con la incorporación de ciertos psicofármacos antidepresivos y psicorreguladores (esquema 7).



ESQUEMA 7. Psicofármacos antidepresivos y psicorreguladores que poseen una acción antiálgica contrastada, sobre todo ante el dolor neuropático.

No sólo algunos fármacos clasificados como antidepresivos poseen una acción a la vez antidepresiva y analgésica, sino que entre los psicorreguladores está la lamotrigina que también cubre este espectro mixto con alta efectividad.

En la terapia antiálgica hay que contar habitualmente con el concurso del efecto placebo. El efecto placebo consiste en la viven-

cia emocional positiva (ilusión y esperanza) o negativa (inseguridad y desconfianza) que acompaña a la administración de un medicamento y que repercute en forma de alivio del dolor en el primer caso y de acentuación del malestar en el segundo. Esta acción no tiene nada que ver con el engaño ni con la sugestión ni tampoco con las condiciones biológicas responsables del dolor. El signo positivo o negativo del efecto placebo y su grado de intensidad dependen de distintas variables, unas adscritas al propio medicamento, como la presentación y la propaganda.

Pero el efecto placebo se vincula sobre todo a la personalidad del médico recetador. Hay médicos placebo-positivos y médicos placebo-negativos, o sea médicos-placebo y médicos-nocebo, médicos que refuerzan la acción del medicamento con un efecto positivo en virtud de la inspiración de confianza y médicos que interfieren la acción del medicamento con el efecto negativo sembrado por la desconfianza, la inseguridad o el rechazo personal.

IV. SITUACIÓN LÍMITE

La asociación del DFC y el SD constituye una situación límite que puede servir de plataforma para una acción desesperada tipo suicidio o eutanasia, una acción desplegada en este caso por una mentalidad carente de autonomía.

El 70 % de los suicidas visita al médico especialista en los seis meses anteriores a su acción suicida. Una gran parte de los enfermos candidatos a la eutanasia abandonan su reclamación de muerte inmediata cuando se sienten aliviados en su sufrimiento psíquico, corporal o social.

En el fondo de ambas cuestiones late el problema de la libertad (esquema 10) y el modo de entender la eutanasia (esquema 11).

Frente a los dogmáticos que se presentan como abanderados de la libertad absoluta y de la autonomía incondicional del enfermo, hay que afirmar que la libertad humana nunca es absoluta, ya que siempre está relativizada, o por su alcance o por su subordinación a otros factores, y que la autonomía del enfermo debe dejar de considerarse como una guía de acción cuando el enfermo ha perdido la libertad ante sí mismo, lo que se produce por ejemplo en los enfermos depresivos respecto a la problemática de la muerte.

Los seres humanos más amenazados por la pena de muerte clínica, o sea, por la eutanasia en su versión distorsionada, son las per-

PRINCIPIOS ACTUALES DE LA ÉTICA CLÍNICA

1. ABANDONO DEL PATERNALISMO
2. ACCIONES DE BENEFICENCIA Y DE NO MALEFICENCIA
3. RESPETO DE LA AUTONOMÍA DEL ENFERMO

LIBERTAD Y
AUTONOMÍA

LIBERTAD RELATIVA (la libertad de matarse a sí mismo encierra la limitación de los compromisos de distinto tipo, contraídos con otras personas).

AUTONOMÍA PERDIDA (la petición de eutanasia es casi siempre un síntoma depresivo o una decisión forzada por el dolor o el miedo al sufrimiento).

ESQUEMA 10. Limitaciones de la libertad individual.

EUTANASIA

INDIRECTA O VERDADERA EUTANASIA: la muerte precipitada por una medicación que trata de anular el sufrimiento (principio del doble efecto).

DIRECTA O PENA DE MUERTE CLÍNICA: la administración de una sustancia con la intención de provocar la muerte.

ESQUEMA 11. Modalidades de eutanasia.

sonas ancianas y los enfermos mentales, sobre todo los enfermos depresivos.

La eutanasia prescrita por la ley holandesa puede aplicarse sin necesidad de que el sufrimiento sea físico y sin que la persona se encuentre en un estado terminal de su enfermedad (Burguess y Hawton, 1988). Los enfermos esquizofrénicos y depresivos que no responden al tratamiento pueden ser equiparados, según la ley holandesa, a un enfermo terminal solicitante de la muerte inmediata, o sea aceptados como candidatos a la eutanasia, siempre que expresen el deseo de morir con un manto de racionalidad, cuando lo importante es identificar lo que lo motiva. Y el verdadero motivo de la pérdida del deseo de vivir de un enfermo mental se encuentra siempre o en el dolor moral propio del estado de ánimo depresivo, o en el sistema delirante que implica el alejamiento de la realidad común.

La administración de una gran dosis de cloruro potásico u otro producto letal nunca puede excusarse con la idea de aliviar el dolor, sino que obedece a la intención pura y dura de matar al paciente.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO-FERNÁNDEZ, F.: *La depresión y su diagnóstico. Nuevo modelo clínico*. Barcelona, Labor, 1988.
- ALONSO-FERNÁNDEZ, F.: *Vencer la depresión con la ayuda del médico, la familia y los amigos*. Madrid, Temas de Hoy, 2.ª edición, 1996.
- ALONSO-FERNÁNDEZ, F.: *El Cuestionario Tetradimensional para la Depresión*. Madrid, Publicaciones TEA, 4.ª edición, 1998.
- ALONSO-FERNÁNDEZ, F.: *Claves de la depresión*. Madrid, Cooperación Editorial, 2.ª edición, 2001.
- ALONSO-FERNÁNDEZ, F.: *El hombre libre y sus sombras*. Barcelona, Anthropos, 2006.
- BURGESS, S. y HAWTON, K.: «Suicide, euthanasia and the psychiatrist». *Philosophy, Psychiatry and Psychology*, 1998; 5: 113-126.
- CHRISTO, P.J.; GRABOW, T.S. y RAJA, S.N.: *Opioid effectiveness, addiction and depression, in chronic pain*. En: Clark y Treisman (editores): *Pain and depression*, Karger, Basilea, 2004, 123-137.
- CLARK, M.R. y TREISMAN, G.J. (eds.): *Pain and depression*, Karger, Basilea, 2004.
- GLOVER, V.; JARMAN, J. y SANDLER, M.: «Migraine and depression: biological aspects». *J Psychiat. Res* 1993; 27: 223-231.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN: «Pain terms: a list with definition and notes on usage». *Pain* 1979; 6: 249-252.
- JACOBY, R. y OPPENHEIMER, C.: *Psiquiatría en el anciano*. Barcelona, Masson, 2005.
- ROMANO, J.M. y TURNER, J.A.: «Chronic pain and depression». *Psychological Bulletin*, 1985; 97: 18-34.
- SCHWARTZ, K.L.; PRATT, L.A.; ARMENIAN, H.K. *et al.*: «Mental disorders and the incidence of migraine headaches in a community sample». *Arch Gen Psych*. 2000; 57: 945-950.
- SLOCUMB, J.C.; KELLNER, R.; ROSENFELD, R.C. y PATHAK, D.: «Anxiety and depression in patients with abdominal pain». *General Hospital Psych*, 1989; 11: 48-53.
- SORDET-GUEPET, H.: «L'insaisissable fibromyalgie». *Évolution Psychiatrique*, 2004; 69: 671-689.

INTERVENCIONES

Prof. López Timoneda

Quiero felicitar al Prof. Alonso Fernández por su magnífica conferencia y quiero hacerle una pregunta. Efectivamente, en el dolor crónico va asociado el dolor y depresión en un 70-80 % de los pacientes. ¿Es el dolor el responsable de la depresión o es la depresión la que produce el dolor?

Prof. Blázquez Fernández

Muchas gracias por su conferencia. Me ha interesado el título de la conferencia y su contenido. Estoy totalmente de acuerdo que evidentemente nunca se ha sentido menos dolor que en las sociedades actuales, las más privilegiadas, pero también es cierto que nunca se ha sabido más del dolor que ahora. Hay unas paces neuroquímicas que se conocen, hay unos aspectos, fundamentos moleculares, que se conocen del dolor, por ejemplo, cómo se transmite la información dolorosa a las neuronas a nivel de receptores, de mediadores químicos, etc.

Ha establecido una relación con la depresión y lógicamente ha salido la serotonina, que es una molécula neurotransmisora importantísima para mantener el estado de ánimo de una persona; de hecho, los antidepresivos lo que hacen es incrementar la concentración de serotonina en la hendidura sináptica. Hay otros péptidos que ha citado, como es el neuropéptido I, que es el agente orexígeno más importante que existe y esto lleva a una de las preguntas que quiero hacerle y es el papel no sólo de la interrelación de dolor y depresión, sino también del control de la ingesta, saciedad, inapetencia o incluso el incremento de la ingesta de alimentos. Esto nos lleva a otras patologías muy frecuentes desgraciadamente en nuestra época, como son las alteraciones de la ingesta de la bulimia, la anorexia, con sus trastornos depresivos y también la obesidad compulsiva. A su vez, el dolor sería negativamente una patología, una sintomatología o sensaciones que se producen, que son menos frecuentes que antes, pero también la depresión es más frecuente que en otras épocas posiblemente porque nuestra constitución psíquica-somática no está preparada a lo largo de la evolución para el tipo de vida que llevamos.

Me gustaría saber la relación entre depresión, dolor y control de la saciedad. No me extraña las citas que ha dicho sobre hallazgos recientes acerca del incremento de la sinapsis ante situaciones dolorosas, porque una de las formas que tienen las neuronas de actuar es incrementar sus interrelaciones con otras. De la misma forma que el efecto placebo, cuando se trata de estudios del sistema nervioso, no necesariamente representa una parte control, porque cualquier cambio de nuestro ambiente puede producir la liberación de estos neurotransmisores, de estos neuropéptidos que actúan de una forma conjunta.

Prof. Rodríguez Rodríguez

El Prof. Alonso-Fernández nos ha mostrado su vitalidad humana y nos ha recordado que el dolor no es sólo dolor físico ni el dolor extremo de cuando hablábamos que a uno le duele inclusive el alma. Dentro de lo que ha mencionado ha referido a la fibromialgia como una entidad fundamentalmente depresiva; efectivamente, nosotros solemos diferenciar a muchos pacientes entre una fibromialgia y un síndrome miofascial; en la fibromialgia, los puntos, la extensión, la clasificación..., pero resulta que este tipo es el que manifiesta una clínica dual más clara. Por ejemplo, si se realiza una electromiografía y se produce la inserción de la aguja en un sujeto normal, aparecen los clásicos potenciales de inserción, finos, agudos, pero no repetidos. Cuando la aguja se coloca en los puntos motores de una fibromialgia aparecen unas salvas muy abundantes, muy específicas de aquellos que tienen la fibromialgia. Estos trabajos se pueden ver en el *American Journal of Physical and Medical Rehabilitation* que han aparecido hace siete meses, son relativamente recientes; demuestra una forma de valorar que la fibromialgia tiene un componente físico objetivable.

Pero también diferenciamos la fibromialgia del síndrome miofascial por las alteraciones del sueño, y sabemos perfectamente que uno del otro se tratan extraordinariamente con un antiepiléptico a dosis inferiores de los antiepilépticos; efectivamente, algo tiene que ver, porque estas pacientes con fibromialgia, la mayoría son mujeres, tienen un cuadro de que no les importa el dolor, de que están mal atendidas, de que no están consideradas, de que no está etiquetada su enfermedad, de que por cualquier cosa aparece el dolor..., tienen un cuadro que sin ser ningún experto en la materia, podríamos etiquetar en lo que el Prof. Alonso-Fernández llamaría el síndrome depresivo.

Lo que no me ha quedado claro es si la fibromialgia es un cuadro depresivo con dolor físico o es un dolor físico con cuadro depresivo o es las dos cosas en una.

Prof. Lucas Tomás

Estamos todos convencidos que el Prof. Alonso-Fernández maneja la depresión con una especial cualificación. Estoy de acuerdo con

usted en que no sólo es un problema clínico, sino también social. Estos enfermos que atendemos en nuestras consultas suelen venir acompañados de varias personas, porque es la familia entera la que sufre el dolor de ese paciente. Es un paciente que ha visitado muchas clínicas, le han hecho todas las exploraciones pertinentes y no han encontrado lesión orgánica en ninguno.

Quiero hacer un comentario del listado que nos ha enseñado de dolor somatotrófico donde había 21 localizaciones. Una de ellas, el colon irritable, después la epigatalgia, después la esofagitis, la glosodinia, la estomatopirosis, los problemas de constitución faríngea... La pregunta que quiero hacerle a este respecto es ¿por qué hay tanta preferencia de localización de ese tipo de dolor en el tubo digestivo? Por último, un comentario sobre la semiología del dolor. Estos paciente tienen en algunos casos un dolor tan definido que decimos que tienen una neuralgia esencial del trigémino; pero cuando tienen una neuralgia difusa no tiene los territorios ni las características, son dolores que aparecen por la mañana, por la tarde desaparecen, por la noche no duele nada. La semiología del dolor es muy particular y el dolor es mortificante, el paciente queda excluido de la vida ordinaria, de la vida social y de relación.

Si dentro del tratamiento de las benzodiacepinas parece ser que a partir de los 45 años no tienen eficacia, ¿qué otro tipo de tratamiento específico para enfermos del área digestiva propone, y si dentro de ellas la psicoterapia podría tener su eficacia?

Prof. Sánchez García

Parece ser que la depresión está de moda, y me ha llamado la atención la cantidad tan grande de medicamentos que pueden ser antidepressivos o depresógenos. El topiramato es un medicamento que está en el mercado y se vende mucho y que se usa para todo menos para lo que se debe; tiene dos indicaciones aprobadas, una es la migraña y otra es como antiépiléptico, y se utiliza de una forma bastante difundida como medicamento para el tratamiento de la obesidad. Desde el punto de vista científico no entiendo por qué, y qué piensa usted de los pacientes a los que les ha administrado como sicorregulador topiramato, ya que la mayoría de las pacientes depresivas están gordas y si realmente han bajado de peso.

Prof. Díaz-Rubio

Quiero felicitarle por su magnífica exposición y la reflexión que ha hecho sobre el dolor y la depresión, y evidentemente plantea una serie de problemas que son síndromes clínicos que se ven con una enorme frecuencia y que los ve no sólo el especialista, sino también el médico de atención primaria, el médico general. Podemos decir que todo el mundo acomete en mayor o menor medida el tratamiento de estas situaciones clínicas, que traducen desde un primer momento un estado depresivo más o menos importante, la mayoría de las veces poco importante, que no interpreta el clínico que debe mandarlo a un psiquiatra y que acomete el tratamiento.

El clínico, en líneas generales, tiende a tratar a estos pacientes de forma insuficiente; primero, no los identifica bien; segundo, los trata insuficientemente con fármacos inhibidores de la recaptación de la serotonina, y nuestra experiencia, que tenemos referida fundamentalmente al tubo digestivo, es que estos fármacos no sirven absolutamente para nada, tienen sus indicaciones en determinadas patologías, pero no en este síndrome clínico multisintomático que pueden aparecer en muchos de estos pacientes. Nuestra experiencia es que solamente responden al tratamiento con fármacos tricíclicos, es decir, fundamentalmente con amitilpetilina, y observamos curiosamente que la mayoría de los médicos de atención primaria y especialistas tratan con amitilpetilina a dosis insuficientes, dosis tan bajas que no sirven para nada, por lo cual aparece un fracaso terapéutico.

Mi pregunta es sumamente práctica: ¿qué piensa de la dosificación de los fármacos antidepresivos que deben ser utilizados en estas circunstancias, y si cree que algunos de estos pacientes fueran al psiquiatra o que pueden ser tratados por un médico de atención primaria o un especialista en su caso?

CONTESTACIÓN DEL PROF. ALONSO FERNÁNDEZ

Agradece a los seis compañeros intervinientes sus atinados y amables comentarios sobre este tema de primordial interés clínico.

Al Prof. López Timoneda: La depresión larvada y el dolor físico-crónico se potencian recíprocamente y el momento inicial se dis-

tribuye entre ambos estados, con un ligero predominio de comienzo anticipado inclinado hacia el cuadro depresivo.

Al Prof. Blázquez Fernández: La duplicación de la incidencia de la enfermedad depresiva en los últimos 50 años puede atribuirse al incremento de diversos factores de riesgo para la salud mental como el estrés, la soledad y los cambios acelerados en la forma de vida, sustentados en el fondo por una crisis de valores, a todo lo cual se agrega el empleo masivo de drogas y la administración de ciertos fármacos.

Por otra parte, la anorexia mental y la bulimia nerviosa son consideradas en psiquiatría como trastornos de frecuente raigambre depresiva. No sólo los trastornos de la conducta alimentaria (la comida nocturna, la comida incontrolada, amén de otros), sino hasta ciertas formas de diabetes, se correlacionan positivamente con la depresión. Existe un sector de enfermos depresivos (aproximadamente el 8% del total), sobre todo mujeres, que cursan con una supresión de la saciedad, lo que les precipita a un estado de obesidad suscitado todo ello por la disminución de los inhibidores del apetito más importantes, como son la bombesina, la colecistoquinina o la leptina (agente de la saciedad).

Al Prof. Rodríguez: Desde la experiencia psiquiátrica lo único que puedo afirmar es que la mayor parte de los casos de fibromialgia se orientan como depresiones larvadas somatotropas.

Al Prof. Lucas Tomás: La acumulación de síntomas somatoformes depresivos en el tubo digestivo tal vez pueda explicarse en función de la hipertonia vagal, o sea colinérgica, muy común en estos cuadros depresivos. Los dolores depresivos corporales son muchas veces erráticos y de curso irregular, como usted bien señala. Finalmente, para el tratamiento de la sintomatología digestiva de una depresión se precisa recurrir a una estrategia terapéutica específica, integrada por una medicación antidepressiva bien seleccionada en dosis más ligeras de lo habitual, una psicoterapia breve y ajustada a las condiciones del individuo y un plan de vida conveniente.

Al Prof. Sánchez García: Todavía se podrían agregar dos indicaciones más al uso del topiramato: como antiimpulsivo y como coadyuvante en el abandono del tabaco. Sin duda, la experiencia

futura irá decantando sus indicaciones que hoy ocupan un espectro demasiado amplio. Los resultados obtenidos en su empleo como corrector preventivo o terapéutico de la obesidad depresiva femenina son más bien defraudantes.

Al Prof. Díaz-Rubio: Estoy totalmente de acuerdo en que la atinada elección del antidepresivo no es una empresa fácil, sino una pauta condicionada por variables diversas, sobre todo la forma clínica, la categoría de la enfermedad depresiva, la personalidad, el estado somático, la situación en la vida, la edad y los antecedentes. La dosificación pertinente para los cuadros larvados dolorosos o con otra sintomatología somática precisa ser bastante más ligera de lo habitual. En cuanto al tratamiento de los enfermos depresivos, creo que exige como pauta previa el establecimiento de un juicio diagnóstico que englobaría al menos el depresograma, la etiología concurrente o los factores de vulnerabilidad, el tipo de personalidad, la comorbilidad y los datos biológicos. A partir de estas precisiones psiquiátricas específicas se desarrolla el seguimiento del enfermo donde muchas veces es imprescindible la colaboración de un médico general o especializado.

**CÓRNEA ARTIFICIAL.
CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA TISULAR**
*ARTIFICIAL CORNEA,
CELL CULTURE AND TISSUE ENGINEERING*

Por el Excmo. Sr. D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ

Académico de Número ¹

Resumen

La córnea, túnica transparente de la región anterior del globo ocular, constituye en este momento, a causa de la escasez de donantes, un órgano diana en la investigación por ingeniería tisular. En el presente trabajo exponemos nuestra experiencia en la construcción de un sustituto completo de córnea utilizando cultivos celulares y distintos protocolos de ingeniería tisular. La metodología consiste en aislar queratocitos, células epiteliales y células endoteliales —las tres poblaciones existentes en la córnea— a partir respectivamente de estroma corneal desnudo, explantes del limbo corneal y de endotelio desprendido enzimáticamente. Las células fueron cultivadas en medios específicos y evaluadas en su viabilidad mediante microscopía electrónica analítica. El constructo completo de córnea se configuró, de un modo semejante a como está estructurada la histología ortotípica de la córnea, tras el depósito sucesivo de células endoteliales, queratocitos inmersos en gel de fibrina y células epiteliales viables.

Abstract

The cornea, the fibrous transparent layer of the eye ball, is becoming a target of tissue engineering research because of the scarcity of donors. We report our experience in developing a mechanism to build a full-thickness corneal substitute using cell culture and protocols of tissue engineering.

¹ Con la colaboración del Prof. Miguel Alaminos Mingorance. El estudio ha sido financiado con los proyectos FIS 03/141 y FIS 04/1983.

Isolation of keratocytes, epithelial and endothelial cells was accomplished by culturing denuded corneal stroma, limbal explant and enzymatically detached endothelium.

Each type of cell was cultured in selective medium. Microanalytical quality control of cell viability was carried out. A multilayered cornea construct was built by sequential deposition of endothelium, keratocytes immersed a gel of human fibrin and epithelium in a manner that reproduce the normal histological structure.

INTRODUCCIÓN

La túnica fibrosa externa del globo ocular está formada por la esclerótica y la córnea. La córnea constituye la parte anterior transparente de dicha túnica y su función principal consiste en evitar la dispersión de la luz incidente. La córnea tiene un espesor de 0,8-0,9 mm en su centro y 1,1 mm en su periferia. Su estructura histológica está constituida respectivamente de delante hacia atrás por tres capas o estratos: un epitelio corneal anterior de carácter pavimentoso, estratificado —5 ó 6 hileras— y no queratinizado, un estroma conjuntivo formado por haces de fibras de colágena regularmente dispuestos entre los cuales existen fibroblastos modificados denominados queratocitos y, finalmente, un epitelio corneal posterior constituido por una hilera de células denominadas células endoteliales. Entre ambos epitelios y el estroma corneal se distinguen dos bandas hialinas acelulares denominadas respectivamente membrana de Bowman y membrana de Descemet. La córnea es braditrofa, es decir, carece de vasos sanguíneos, lo que significa que se nutre por difusión. Las células madre que generan las células del epitelio están situadas en el limbo esclerocorneal (Genser, 2000).

La carencia de vasos y la ausencia de células de Langerhans en el epitelio corneal ha hecho del trasplante de córnea un tratamiento de elección para numerosas patologías corneales que alteran significativamente la visión o que incluso pueden producir ceguera². La escasez de donantes y los fenómenos de rechazo que con algu-

² En diciembre de 2005 se conmemora el centenario del primer trasplante de córnea. Dicho trasplante se realizó el 7 de diciembre de 1905 por el Dr. Eduard Zirm (1863-1944) en Olomouc, actualmente en la República Checa. El paciente era Alois Gloger, de 43 años, ciego tras un accidente con cal. El donante fue un niño de 11 años. Tras la intervención el paciente recuperó la vista hasta el final de sus días. El presente trabajo se comunica a la Academia con motivo del centenario.

na frecuencia se producen han planteado la necesidad de buscar algún tipo de solución alternativa (Nishida, 2003; Bleckmann, 2005).

La construcción de tejidos artificiales viables de naturaleza biológica equivalentes a los tejidos y órganos corporales constituye en el momento presente la alternativa más importante a los problemas que genera el trasplante en algunas localizaciones y a la propia imposibilidad de llevar a cabo un trasplante en algunas otras. A raíz de esta realidad el paradigma de la ciencia histológica ha cambiado de modo muy significativo en los últimos veinte años. La histología —la ciencia de los tejidos— ha dejado de ser una ciencia meramente descriptiva o como mucho funcional para convertirse en una ciencia constructiva cuya misión consiste no sólo en conocer cada vez mejor la naturaleza de los distintos tejidos de nuestro cuerpo, sino en elaborar y construir tejidos nuevos utilizando los propios elementos biológicos que los componen y, en su caso, materiales inertes de distinta naturaleza. A esta nueva orientación de la histología se le ha denominado ingeniería tisular. Se ha pasado, por tanto, de una histología útil sólo para el diagnóstico, a una histología útil también para la terapéutica (Campos, 2004).

La córnea, la túnica transparente de la región anterior del globo ocular, constituye en el momento presente, a causa de la escasez de donantes anteriormente citada, un órgano diana en la investigación por ingeniería tisular. Las córneas artificiales elaboradas por ingeniería tisular pueden constituir asimismo, como ha indicado Tegtmeier (2001), un posible modelo para la investigación *in vitro* de la permeabilidad de fármacos (Reichl, 2003, 2004).

El presente trabajo tiene por objeto exponer nuestra experiencia en la construcción de un sustituto completo de córnea utilizando para ello cultivos celulares de las tres estirpes existentes en la córnea y la elaboración de un estroma artificial fabricado en el laboratorio.

CULTIVOS CELULARES

Los cultivos de las tres estirpes celulares existentes en la córnea se realizaron a partir de córneas de conejo adulto. Los conejos, en número de cinco y de raza albina New Zealand, fueron sacrificados bajo anestesia general, siguiendo los protocolos establecidos. Las córneas extraídas se mantuvieron a 4°C en medio de cultivo RPMI

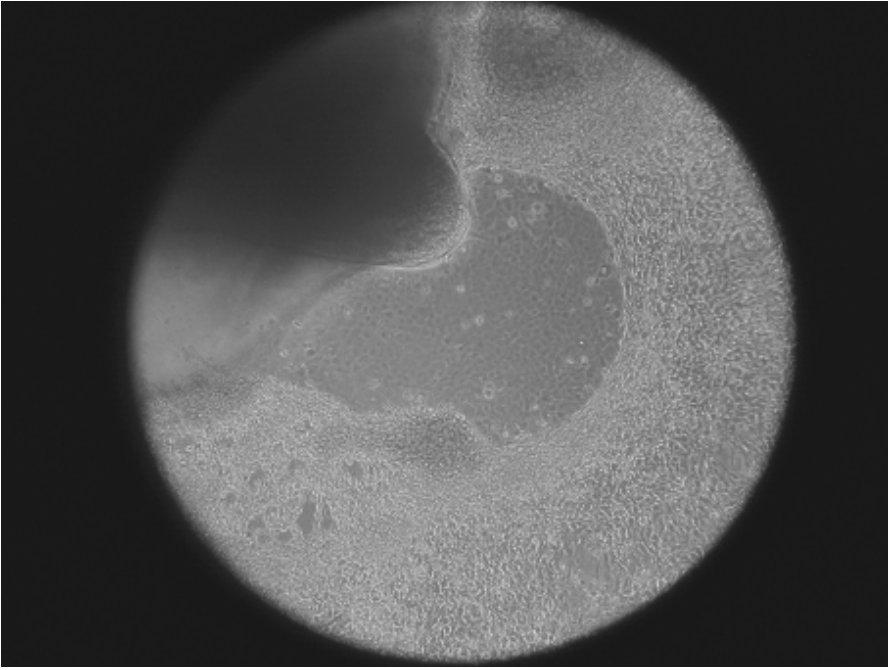


FIGURA 1.

suplementado con antibióticos y antimicóticos hasta el momento en que fueron utilizadas para realizar el aislamiento de las células con destino a su cultivo.

El aislamiento de las células epiteliales se realiza de dos modos distintos. A partir, en primer lugar, de la disección quirúrgica del limbo corneal y de la posterior fragmentación mecánica del mismo a partir, en segundo lugar, de la digestión enzimática con tripsina y EDTA (Fig. 1). El cultivo celular se realiza en medio específico para queratinocitos (DMEM y HAM-F12 suplementado con EGF) sobre una capa de células alimentadoras de fibroblasto de ratón 3T3. El medio contiene 10 % de suero bovino fetal, antibióticos, toxina colérica, hidrocortisona, insulina, tiroxina y adenina (Meana, 1998). La identificación de las células epiteliales se realizó con criterios morfológicos y tras determinar la expresión del gen queratina K12 por RT-PCR (Orwin, 2000; Rabinowitz, 2005).

El aislamiento de las células endoteliales se realiza a partir de la digestión enzimática con Tripsina y EDTA y la posterior separación mecánica del endotelio corneal. El cultivo se realiza en medio

específico. Se trata de un medio semejante al anteriormente descrito pero sin factor de crecimiento epidérmico. La identificación de las células endoteliales se realizó determinando la expresión del gen colágeno-8 y la no expresión del gen de la queratina K12. Morfológicamente las células endoteliales modifican su clásico patrón hexagonal *in vivo* para pasar a ofrecer un patrón generalmente elongado (Orwin, 2000; Rabinowitz, 2005).

El aislamiento de las células del estroma —los queratocitos— se lleva a cabo una vez retirados de la córnea los epitelios anterior y posterior. Tras la fragmentación mecánica del estroma los explantes se cultivan en DEMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina y antibióticos. El análisis por medio de RT-PCR demostró que los queratocitos, a diferencia de las otras células aisladas de la córnea, no expresan los genes colágeno 8 ni queratina K12. La morfología de los queratocitos en cultivo es fusiforme (Orwin, 2000; Rabinowitz, 2005).

INGENIERÍA TISULAR

Para la construcción de un sustituto completo de córnea además de aislar y mantener en cultivo las tres estirpes celulares existentes en la misma es imprescindible fabricar en el laboratorio un sustituto del estroma corneal que sea lo más parecido posible al estroma *in vivo*, esto es, que sea lo más consistente y transparente posible. En nuestro modelo el material utilizado ha sido un gel de fibrina humana con un 0,1 % de agarosa (Alaminos, 2005). La fibrina, utilizada también para la construcción artificial de otros tejidos (Han, 2002), fue obtenida de plasma humano congelado de donantes de sangre, procedente del Banco de tejidos de Granada (Prof. Fernández Montoya). Para elaborar el gel se añaden a 12 ml de plasma humano, 10 ml de solución salina, 1 ml de cloruro cálcico y antifibrinolíticos. Al gel se incorporan asimismo 500.000 queratocitos cultivados en DEMEM con 10 % de suero bovino fetal y se añade al mismo tiempo 0,1 % de agarosa. La agarosa facilita la consistencia y permite realizar suturas en las córneas artificiales.

Una vez elaborado el sustituto estromal la construcción del sustituto completo de córnea se realizó en varias fases utilizándose para llevar a cabo dicha construcción un dispositivo de cultivo Transwell con soporte poroso. El diámetro de los poros del dispositivo es

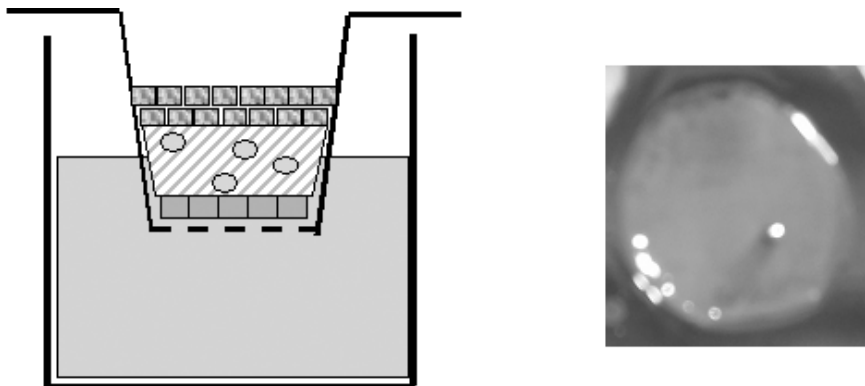


FIGURA 2.

de 0,4 micras, que permite el paso de nutrientes pero no el tránsito celular (Reichi, 2003, 2004).

La primera fase consiste en colocar sobre el soporte poroso, el cual está inmerso en medio de cultivo, una capa de células endoteliales. La segunda fase consiste en depositar 24 horas más tarde, sobre la capa de células endoteliales, el sustituto estromal con los queratocitos incorporados, construido de acuerdo con la metodología arriba indicada. La tercera fase consiste en depositar sobre el estroma las células epiteliales, las cuales se mantienen sumergidas en medio de cultivo, sobre el estroma y las células endoteliales, un mínimo de dos semanas. Con posterioridad, y durante otras dos semanas, el constructo de córnea se mantiene en cultivo en interfase aire-líquido con el objeto de estimular la estratificación epitelial (Richard, 1991; Chang, 2000) (Fig. 2).

El desarrollo de la ingeniería tisular de la córnea tiene por delante un importante número de retos. En primer lugar, es necesario evaluar la viabilidad de las células a utilizar en la construcción de las córneas artificiales. Para ello, además de utilizar los métodos clásicos basados en colorantes de exclusión, como el azul tripan, es imprescindible introducir en los estudios de viabilidad la determinación de los iones intracelulares a través de la microscopía electrónica analítica cuantitativa. Esta metodología permite evaluar dicha viabilidad con carácter previo a la muerte celular y, por tanto, seleccionar adecuadamente la población celular que debe utilizarse para la mejor elaboración de un constructo (Fernández Segura, 1999a, 1999b). En segundo lugar, uno de los retos más importan-

tes de la ingeniería tisular de la córnea es, sin duda, el de indentificar qué tipo de matriz es la que puede proporcionar más transparencia y consistencia al estroma, pues se ha probado que los distintos materiales sintéticos, que generalmente utiliza la ingeniería tisular, no pueden reproducir con eficacia al muy organizado y estructurado estroma original de la córnea (Storm, 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- ALAMINOS, M.; SÁNCHEZ-QUEVEDO, M.C.; MUÑOZ-ÁVILA, J.I.; SERRANO, D.; MEDIALDEA, S.; CARRERAS, I.; CAMPOS, A. (2005): «Construction of an organotypic rabbit cornea substitute by tissue engineering». *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (remitido para publicación).
- BLECKMANN, H.; HOLAK, S. (2005): «Preliminary results after implantation of four AlphaCor artificial corneas». *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 17: 1-5.
- CAMPOS, A. (2004): «Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular». Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid.
- CHANG, J.E.; BASU, S.K.; LEE, V.H.L. (2000): «Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies». *Pharm. Res* 17: 670-676.
- FERNÁNDEZ-SEGURA, E.; CAÑIZARES, F.J.; CUBERO, M.A.; CAMPOS, A.; WARLEY, A. (1999a): «A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscopy». *Journal of Microscopy* 196: 19-25.
- FERNÁNDEZ-SEGURA, E.; CAÑIZARES, F.J.; CUBERO, M.A.; WARLEY, A.; CAMPOS, A. (1999b): «Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis». *Experimental Cell Research* 253: 454-462.
- GENESER, F. (2000): *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- HAN, B.; SCHWAB, I.R.; MADSEN, T.K.; ISSEROFF, R.R. (2002): «A fibrin-based bioengineering ocular surface with human corneal epithelial stem cells». *Cornea* 21: 505-510.
- MEANA, A.; IGLESIAS, J.; DEL RÍO, M.; LARCHER, F.; MADRIGAL, B.; FRESNO, M.F.; MARTIND, C.; SAN ROMÁN, F.; TEVAR, F. (1998): «Large surface of cultured human epithelium obtained on a termal matriz base on live fibroblast-containing fibrin gels». *Burns* 24: 621-630.
- NISHIDA, K. (2003): «Tissue engineering of the cornea». *Cornea* 22: S28-S34.
- ORWIN, E.J.; HUBEL, A. (2000): «In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix». *Tissue Eng.* 6: 307-319.
- RABINOWITZ, Y.S.; DONG, L.; WISTOW, G. (2005): «Gene expression profile studies of human keratoconus cornea for NEIBank: a novel cornea-expressed gene and the absence of transcripts for aquaporin 5». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 1239-1246.

- REICHL, S.; MULLER-GOYMANN, C.C. (2003): «The use of a Porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride». *Int. J. Pharm.* 250: 191-201.
- REICHL, S.; BEDNARZ, J.; MULLER-GOYMANN, C.C. (2004): «Human corneal equivalent as cell culture model for un vitro drug permation studies». *Br. J. Ophthalmol.* 88: 560-565.
- RICHARD, N.R.; ANDERSON, J.A.; WEISS, J.L.; BINDER, P.S. (1991): «Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study». *Curr. Ye. Res.* 10. 739-749.
- STORM, C.; PASTORE, J.J.; MACKINTOSH, F.C.; LUBENSKY, T.C.; JANMEY, P.A. (2005): «Nonlinear elasticity in biological gels». *Nature* 435: 191-194.
- TEGTMAYER, S.; PAPANTONIOU, I.; MULLER-GOYMANN, C.C. (2001): «Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride». *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51: 119-125.

INTERVENCIONES

Prof. Munuera Martínez

Quiero agradecer y felicitar al Prof. Campos por una preciosa presentación, no sólo desde el punto de vista formal, que ha sido magnífica, sino de contenido. En el año 1983 tuve la oportunidad de escuchar al Prof. Henry Mankin, que es un prestigioso cirujano ortopédico, su conferencia titulada «Ortopedia año 2013, una prospectiva», y en ella terminaba diciendo que gracias a nuestro conocimiento de la célula y a nuestra capacidad de manipularla, iban a cambiar los paradigmas de nuestra especialidad, y decía lo siento por los que ponéis todavía prótesis, pero las articulaciones sobrevivirán. Yo creo que esto es un ejemplo de que las córneas sobrevivirán.

En el biorreactor que nos ha presentado, obedeciendo a su inquietud sobre los factores mecánicos, a través del flujo dirigido de una manera determinada, se puede resolver el problema de la conformación mecánica.

Prof. Rodríguez Rodríguez

Quiero recordar al Prof. Campos algo que he vivido: fue en 1961-62, haciendo la tesis en la Facultad de Medicina de Valladolid, sobre los tejidos de cultivos, cultivos celulares, y los procedimientos

eran un tanto arcaicos. Un compañero trabajó con los cultivos de córnea y no salían nada bien, era sumamente difíciles; aunque se intentaba cortar el epitelio, no salía bien, hasta que un día mezclamos y pusimos fibroblastos de embrión de pollo y un trozo de la córnea troceada, y aquello funcionaba muy bien. Hoy he aprendido el por qué: teníamos un sustrato de fibroblastos con la córnea, y le doy las gracias porque hasta hoy no le he sabido.

Prof. González Barón

Tengo que felicitar al Prof. Campos porque he disfrutado mucho con su conferencia. Para los clínicos que nos dedicamos a la oncología, a medida que el Prof. Campos hablaba, iba haciendo extrapolación a otros tejidos. Nosotros nos encontramos con problemas como las escaras, terrible problema que no se ha solucionado, y las mucositis, y el Prof. Campos ha hablado de las mucosas orales. Uno de los grandes problemas que tenemos tanto en tratamientos de quimioterapia como muchos más en radioterapia, son las mucositis y todo lo que conllevan, no solamente dolor y sufrimiento, sino todas las puertas de entrada de infecciones de gérmenes de todo tipo.

Próximamente, en la clínica vamos a disponer de un elemento que nos parece magnífico, que es un factor de crecimiento de queratocitos, es decir, de fibroblastos madurados para el tratamiento de las mucositis. Me ha llamado la atención que este producto, que ya está a punto de salir al mercado, no se utilice en el tema de la córnea; quizás la densidad y la transparencia de la córnea tenga que ver con un grado de no pasarse en fibroblastos para que la transparencia sea mejor. Es un producto de ingeniería genética aplicada y será un arma extraordinaria para su investigación.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

Quiero agradecer públicamente a ambos conferenciantes. El primer ponente, Prof. Alonso-Fernández, ha entrado con su gran conocimiento en la relación dolor físico y depresión. Fue un panorama de investigación clínica hace bastantes años, que sigue siendo de una importancia grande. Sólo personas de gran preparación psi-

quiátrica, como es el Prof. Alonso-Fernández puede acometer como él ha hecho perfectamente, este tema trascendente. Ha buscado los lugares de común relación de dos grandes procesos tan frecuentes, el dolor y la depresión. Le felicito por su espléndida conferencia.

El segundo conferenciante, Prof. Campos Muñoz, ha hablado de ingeniería tisular a nivel de la córnea. El gran conocimiento del Prof. Campos en cuestiones histológicas permite obtener resultados ya y en lo que nos ha anunciado para otros tejidos próximamente. Es una vez más la importancia de la aplicación de las técnicas, no tan clásicas, porque muchas de ellas al oírle se da cuenta de la innovación metodológica en esos campos de la histología, la trascendencia que ello tiene y puede tener. La córnea es un lugar muy selectivo de frecuentes lesiones, de lesiones que se reproducen, y cuya evolución, desarrollo y complicaciones dan origen a importantes defectos y alteraciones. Sin duda, en la córnea o en los otros tejidos esta nueva aplicación metodológica dará origen a importantes resultados en la aplicación clínica.

Le felicito, Prof. Campos, muy sinceramente, ya que siempre ha sido distinguido en su ocupación de la investigación.

Se levanta la sesión.

XVIII SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 8 DE NOVIEMBRE DE 2005

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

**COMPRENDER LA MUERTE CELULAR:
UN RETO PARA LA BIOMEDICINA**

***UNDERSTANDING CELL DEATH:
A CHALLENGE FOR BIOMEDICINE***

Por el Excmo. Sr. D. JOSÉ VILCHES TROYA

Presidente y Académico de Número de la Real Academia
de Medicina y Cirugía de Cádiz

**EL HOMBRE Y EL MAR:
FITOPLANCTON MARINO Y SALUD PÚBLICA**

***THE MAN AND THE SEA:
MARINE PHYTOPLANCTON AND PUBLIC HEALTH***

Por el Ilmo. Sr. D. JOSÉ MIRA GUTIÉRREZ

Vicepresidente y Académico de Número de la Real Academia
de Medicina y Cirugía de Cádiz

COMPRENDER LA MUERTE CELULAR: UN RETO PARA LA BIOMEDICINA

UNDERSTANDING CELL DEATH: A CHALLENGE FOR BIOMEDICINE

Por el Excmo. Sr. D. JOSÉ VILCHES TROYA *

Presidente y Académico de número de la Real Academia
de Medicina y Cirugía de Cádiz

Resumen

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que se constituye en el destino natural de las células diferenciadas. Es esencial para el diseño de los tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto y su desregulación es la base común de enfermedades diversas. Todo esto sugiere que no es resultado de la casualidad o el azar, sino consecuencia de un complejo mecanismo incluido en la programación genética de la célula que se pone en marcha de forma activa en respuesta a determinadas condiciones del entorno. Es una muerte celular programada que cursa con unas características morfológicas y bioquímicas típicas. Es, por tanto, un proceso activo, programado y modulable, de ahí su importancia fundamental: el conocimiento de los factores que la modulan puede ayudarnos a entender múltiples estados fisiológicos y patológicos de nuestro organismo.

La ejecución del programa de muerte se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos, que incluyen alteraciones mitocondriales, encogimiento celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, burbujeo de membrana, activación de caspasas, translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular y formación de vesículas rodeadas de membrana, llamadas cuerpos apoptóticos.

* En este trabajo ha colaborado la Profesora Titular de Universidad Dra D^a Mercedes Salido Peracaula, Académica Correspondiente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz.

En la apoptosis interviene una vía conservada durante la evolución, cuya inducción puede deberse a estímulos externos o internos. Esto se traduce en dos grandes vías de respuesta: la vía extrínseca o mediada por receptores y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas convergen en unas proteínas efectoras características llamadas caspasas, si bien, las mitocondrias pueden desencadenar una secuencia de muerte independiente de caspasas. Las principales proteínas reguladoras incluyen a la familia bcl-2, en las que se distinguen tres grupos: proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-x L, proteínas proapoptóticas, Bax, Bak y proteínas BH3-only. El oncogen p53 tiene también, un papel en la expresión de genes que conducen a la apoptosis.

En la apoptosis, la mitocondria desempeña dos papeles primordiales: proporciona energía en forma de ATP, lo cual es fundamental para la célula que muere vía apoptosis, y libera proteínas proapoptóticas que normalmente están secuestradas en el espacio intermembrana, hacia el citosol donde desencadenan la cascada de señales apoptóticas. El potencial de membrana mitocondrial (MMP), $\Delta\Psi_m$, puede controlar la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y regular la liberación de citocromo c y otras proteínas, que pueden dividirse en dos grupos: el primero incluye a citocromo c, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, que activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas y en el segundo, la endonucleasa G y el AIF (factor inhibidor de apoptosis) se transloca al núcleo e induce la degradación del ADN por una vía caspasa independiente. Cuando las mitocondrias pierden su $\Delta\Psi_m$ se hinchan y liberan las proteínas intermembrana (proteínas IMs). La hiperpolarización, además, se ha relacionado recientemente con los cambios apoptóticos subsiguientes, a través de las alteraciones que se provocan en la cadena de transporte electrónico.

En síntesis, la comprensión de los factores moduladores, de la maquinaria intracelular, de los mecanismos reguladores y, finalmente del papel de las mitocondrias nos aproximan a un fenómeno que constituye el eje central de una serie de enfermedades en las que la sobreexpresión o la inhibición de la muerte celular programada es responsable de las manifestaciones clínicas.

Abstract

Apoptosis or programmed cell death (PCD) is a physiological process that constitutes the natural fate of end-stage differentiated cells. It is essential for tissue patterning during embryonic development and for maintenance of tissue homeostasis of the adult organism. The execution of the death programme is characterized by a sequence of morphological and biochemical changes. These include early mitochondrial alterations, cell shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation, membrane blebbing, caspase activation, the presentation of phosphatidylserine at the cell surface, and the formation of membrane bound vesicles termed apoptotic bodies. The apoptosis is evolutionary conserved. The main regulatory proteins involved include caspases and bcl-2 family proteins. Three groups of the Bcl-2 family proteins can be distinguished: the antiapoptotic proteins, like Bcl-2 and Bcl-x L, the pro-apoptotic members e.g., Bax, Bak and the BH3-only proteins.

In apoptosis mitochondria have two essential functions. First, provide energy, in the form of ATP, which is required for cells to die by the apoptosis

pathway. Second, to release pro-apoptotic proteins normally sequestered in the intermembrane space into the cytosol where they trigger downstream apoptotic signaling pathways. Mitochondrial dysfunction in apoptosis is related with specific permeabilization of the outer mitochondrial membrane to large molecules. They can be divided into two groups. First, cytochrome c, Smac/DIABLO and HtrA2/Omi, activates the caspase dependent mitochondrial pathway. The second group, endonuclease G and AIF translocate to the nucleus and induce DNA degradation in a caspase independent manner.

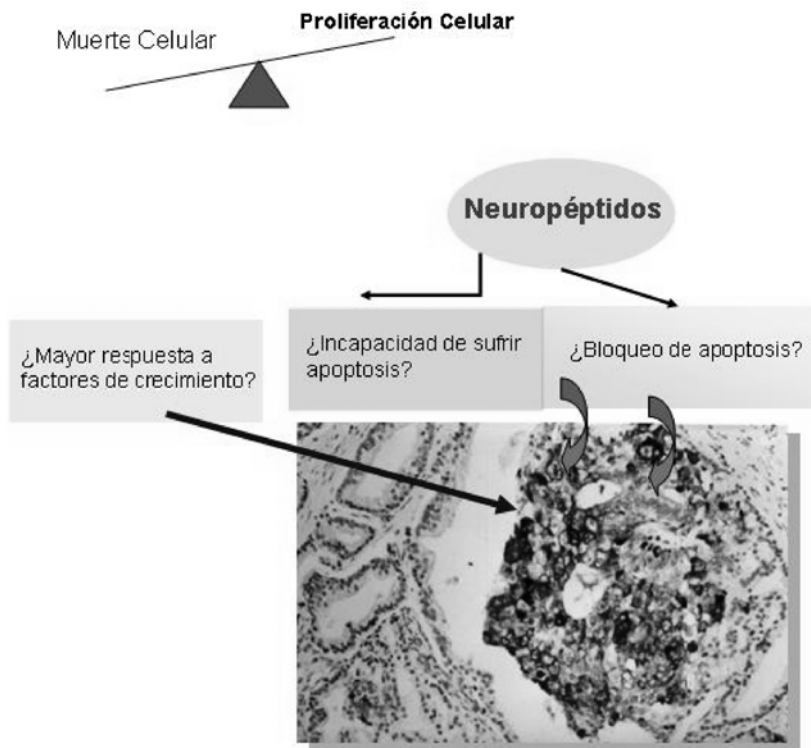
Mitochondrial membrane potential (MMP), $\Delta\Psi_m$, may control the permeability of the outer membrane and regulate cytochrome c release. When the mitochondria loss their $\Delta\Psi_m$ undergo swelling, and release IMs proteins.

Desde hace años, nuestro Grupo de Investigación viene trabajando en el estudio de los factores que pueden condicionar el desarrollo y evolución del carcinoma prostático, una patología de diagnóstico frecuente y que, previsiblemente se incrementará en años venideros. Nuestro interés radica fundamentalmente en el hecho de que, a pesar de ser un carcinoma que responde inicialmente en un 80 % al tratamiento de ablación androgénica, la mayoría recidiva, debido probablemente a la presencia de clones heterogéneos en el seno del tumor. Algunos de esos clones son, o se vuelven con la evolución de la enfermedad, andrógeno-independientes. Por tanto la evolución del tumor depende de otros factores aun no bien determinados.

Teniendo en cuenta que la evolución de toda población celular es el resultado de un balance controlado entre la proliferación y la muerte celular, y que la aparición del cáncer supone una alteración de ese delicado equilibrio biológico, nuestra línea de trabajo, se ha basado en el estudio de posibles mecanismos moduladores en el carcinoma prostático. Concretamente nos estamos centrando en el papel de los productos de secreción de las células neuroendocrinas, presentes en la próstata en condiciones normales y en algunos carcinomas en forma de diferenciación neuroendocrina. La importancia de este hecho radica en que los tumores que presentan dicha diferenciación neuroendocrina suelen tener una mala respuesta al tratamiento. Trabajamos, por tanto, intentando desentrañar parte de los mecanismos mediante los cuales la presencia de estas células influye en la progresión tumoral. Para ello, varias han sido las hipótesis de trabajo que sucesivamente nos hemos planteado en función de los resultados obtenidos, que han confirmado o rebatido hallazgos previos nuestros y de diferentes autores y que han aportado interesantes conclusiones novedosas.

El resultado, hasta el momento, ha sido la obtención de un modelo experimental reproducible y validado para el estudio de factores moduladores de apoptosis en el carcinoma prostático en el que seguimos trabajando y que nos está permitiendo arrojar cierta luz sobre los mecanismos que regulan la muerte celular en esta patología, a la vez que profundizar en la comprensión de la apoptosis.

Una vez justificado nuestro interés por el tema, pasaremos a exponer la perspectiva actual de la muerte celular programada, necesariamente acotada por el tiempo del cual disponemos, esperando contribuir con nuestra exposición en lo que hoy constituye un reto para la biomedicina, puesto que su comprensión y control contribuirá a la lucha contra numerosas y diversas patologías que, aún teniendo una etiología distinta, muestran como fenómeno central a la apoptosis.



Hipótesis inicial de trabajo: la presencia de neuropéptidos secretados por las células neuroendocrinas podría influir de tres formas diferentes sobre el comportamiento de las células neoplásicas. (Iconografía original).

CONCEPTO DE APOPTOSIS Y NECROSIS

Para todo organismo vivo, y la célula es un organismo vivo, existe un momento para nacer y uno para morir. Hay dos formas en las que puede morir una célula, una provocada por agentes lesivos, otra induciendo su suicidio.

Las células que son dañadas por agentes como daños mecánicos o exposición a tóxicos mueren tras sufrir hinchazón generalizada, debido a lesiones irreversibles de la membrana que la llevan finalmente a un estallido y a verter su contenido al exterior, lesionando así a las células adyacentes y provocando una respuesta inflamatoria. Este tipo de muerte celular recibe el nombre de **necrosis**.

Sin embargo, la mayoría de las células que mueren en un organismo sano utilizan un mecanismo diferente que permite su eliminación o suicidio sin daños a las células vecinas, ni alteraciones violentas de la membrana celular y con una serie de cambios morfológicos y bioquímicos secuenciales y comunes. Este tipo de muerte recibe el nombre de **apoptosis**. [Kerr, 1972].

La apoptosis es un proceso fisiológico común, indispensable para el desarrollo embrionario y el modelaje de los órganos así como para la capacitación de las células del sistema inmunitario y la selección de poblaciones celulares viables. Aparece por ejemplo en la selección de espermatogonias que madurarán a espermatozoides o de los folículos ováricos que deben madurar para poder ser fecundados, en la capacitación de los linfocitos o la desaparición de las membranas interdigitales o el diseño del sistema nervioso. Más del 50 % de las células del embrión muere por apoptosis durante el desarrollo del individuo.

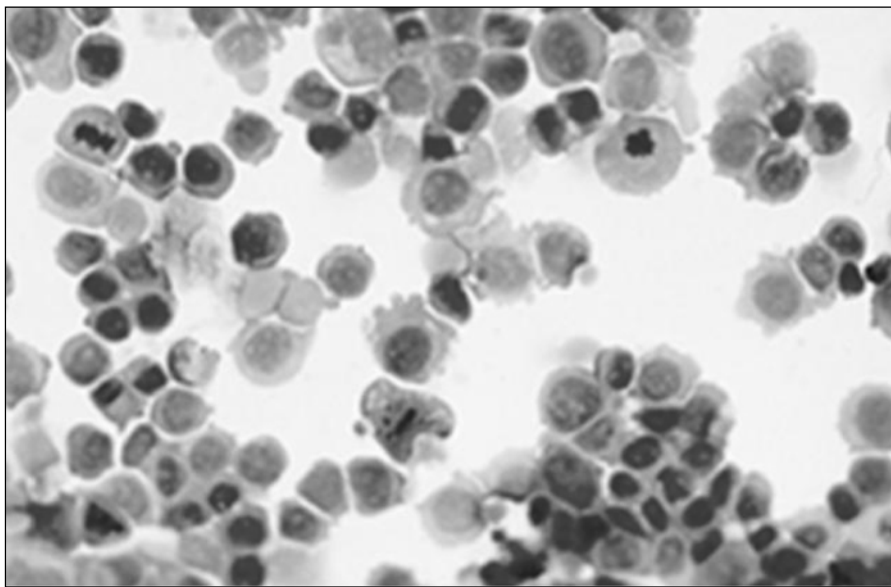
Todo esto sugiere que este tipo de muerte no es resultado de la casualidad o el azar, sino consecuencia de un complejo mecanismo incluido en la programación genética de la célula que se pone en marcha de forma activa en respuesta a determinadas condiciones del entorno. Es una **muerte celular programada** que cursa con unas características morfológicas y bioquímicas típicas. Es, por tanto, un proceso **activo, programado y modulable**, de ahí su importancia fundamental: el conocimiento de los factores que la modulan puede ayudarnos a entender múltiples estados fisiológicos y patológicos de nuestro organismo.

CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONALES DE LA APOPTOSIS

Apoptosis es una palabra griega que significa «caída de las hojas de los árboles en otoño o «caída de los pétalos de una flor». Utilizado por vez primera en 1972 por John Kerr, patólogo australiano, para describir la formación de unas estructuras denominadas «cuerpos apoptóticos» en la célula que muere por apoptosis, el fenómeno se describe por Carl Vogt, sin embargo, más de 100 años antes, en 1842.

La célula que muere por apoptosis lo hace siguiendo un patrón morfológico común: encogimiento, burbujeo de la membrana plasmática, pcnosis nuclear y condensación citoplásmica y finalmente desintegración de la célula en vesículas siempre rodeadas de membrana, algunas con contenido nuclear llamadas cuerpos apoptóticos, que son fagocitadas por las células vecinas o por macrófagos sin desencadenar respuesta inflamatoria ni provocar lesión a las células vecinas.

Simultáneamente se producen cambios bioquímicos cuantificables: las mitocondrias liberan citocromo c, en la membrana plasmá-



Marcadas con (♣) observamos células en los estadios iniciales del proceso, con (⚡) células en estadios mas avanzados que presentan burbujeo de membrana y finalmente marcadas con (↓) células que han pasado a convertirse en cuerpos apoptóticos. Tinción con hematoxilina-eosina de extensiones celulares obtenidas en nuestro laboratorio de células neoplásicas prostáticas Du 145, fijadas en formol. x40

tica se produce una translocación de la fosfatidilserina a la cara externa que va a actuar como señal para los macrófagos, el ADN se fragmenta de forma regular entre los nucleosomas.

La apoptosis se asocia con cambios específicos en la morfología celular y en sus macromoléculas, pero también se acompaña de cambios en la distribución de los iones intracelulares y alteración en los potenciales de membrana. En particular se ha asociado a la pérdida de iones K^+ [Bortner, 1997. Dallaporta, 1998, 1999].

El mantenimiento de los gradientes iónicos fisiológicos intracelulares exige una diferencia de concentración de Na^+ y K^+ a lo largo de la membrana celular. Este proceso requiere un aporte adecuado de energía, integridad de membrana y actividad enzimática específica. Cuando la bomba de Na^+/K^+ es insuficiente para mantener los gradientes, en ausencia de un potencial efectivo de membrana se produce salida de iones calcio a través de canales dependientes de voltaje. Así, un aumento de la ratio Na/K intracelular reflejará las condiciones fisiopatológicas de la células, siendo un marcador muy sensible de diferentes tipos de lesión celular, entre la que se encuentra la apoptosis.

Esta pérdida de K^+ se relaciona con los cambios en el volumen celular que, universalmente, se asocian con la apoptosis. Se han relacionado también con la activación de enzimas de la cascada apoptótica y por tanto con la degradación del ADN. [Hughes, 1999; Montague, 1999].

FACTORES MODULADORES DE LA APOPTOSIS

Hay dos razones fundamentales que pueden hacer que una célula ponga en marcha su programa de muerte:

1. Que la muerte celular sea tan necesaria para el correcto desarrollo como la mitosis: la formación de los dedos, la descamación del endometrio durante la menstruación, la formación de sinapsis funcionales...

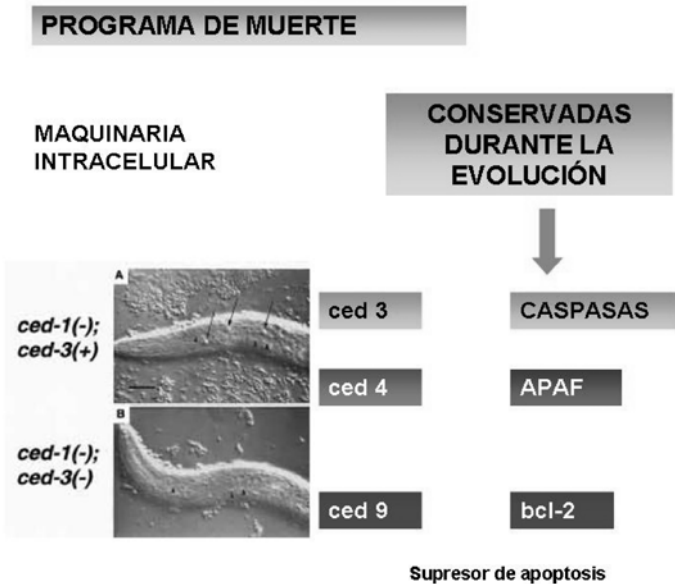
2. Que la muerte celular sea necesaria para destruir células que representen una amenaza para el organismo: células activadas del sistema inmunitario, células no competentes del sistema inmunitario, células infectadas por virus, células con ADN dañado que pueden causar malformaciones congénitas durante el desarrollo embrionario o cáncer en sujetos desarrollados.

En definitiva, cuando la célula percibe señales de «autoestima» que la hacen sentirse necesaria, reprime su programa de muerte; cuando la célula pierde esas «señales de autoestima» o recibe señales negativas pone en marcha el programa de muerte. El balance continuo entre ambas es lo que hace posible el funcionamiento normal del organismo.

El control de la apoptosis está integrado por: una maquinaria intracelular programada para desencadenar la muerte celular y unas vías reguladoras capaces de modular a la maquinaria de apoptosis.

MAQUINARIA INTRACELULAR

Los estudios iniciales acerca de la regulación de apoptosis se llevaron a cabo en un gusano llamado *Caenorhabditis elegans*, en el cual se conoce el número exacto de células que lo componen y cuantas de ellas mueren durante su desarrollo por apoptosis. Por tanto, el análisis genómico de ambas poblaciones permitió identificar un gen (llamado *ced 3* o gen de muerte 3) presente en todas las células que no mueren y mutado en todas las que mueren por apop-



Maquinaria intracelular de la apoptosis. Esquema original. Fotografías de *C-elegans* modificadas del discurso de aceptación del Premio Nobel por Robert Horvitz.

tosis. Las proteínas sintetizadas por ese gen se denominaron **caspasas** y hoy se sabe que constituyen el corazón de la maquinaria apoptótica. [Degterev 2003]

Posteriormente se descubrió que para que se desencadenase la apoptosis era necesaria la asociación del gen *ced 3* con un gen *ced 4*, del que también se descubrió la contrapartida humana, a la que se denominó **Apaf (o factor activador de la apoptosis)**.

Más tarde, se identifica el gen **bcl-2** en el desarrollo linfocitario como determinante del fenotipo apoptótico en el proceso de selección y se ve que este gen resulta ser homólogo con el gen *ced-9* de *C elegans* y cuyo papel en ambos casos es el de suprimir la apoptosis.

Esta concordancia sugiere, por tanto, que en la apoptosis interviene una vía conservada durante la evolución, cuya inducción puede deberse a estímulos externos o internos. Esto se traduce en dos grandes vías de respuesta: **la vía extrínseca o mediada por receptores** y **la vía intrínseca o mitocondrial**. Ambas **convergen** en unas proteínas efectoras características llamadas **caspasas**, si bien, como veremos posteriormente, las mitocondrias pueden desencadenar una secuencia de muerte independiente de caspasas.

Se han identificado 11 caspasas diferentes hasta el momento. Son proteínas que se sintetizan como precursores inactivos (procaspasas) y permanecen así en el citoplasma a la espera de ser activadas. Una vez que la célula recibe la señal de muerte esta activación es muy rápida y provoca los cambios celulares característicos del proceso de apoptosis.

Esta activación rápida sugiere una regulación intracitoplásmica del proceso, no a nivel de transcripción, y se han sugerido dos mecanismos básicos:

- **Activación en cascada:** En el cual una **caspa de inicio**¹ activa a una serie de **caspasas efectoras** de modo secuencial. Una vez activadas cada una de ella actuaría sobre sustratos celulares específicos. Este modelo plantea una interesante pregunta: ¿Quién activa a la caspa de inicio?
- **Oligomerización:** Las caspasas pueden activarse al unirse a otras proteínas acompañantes. Esto sugiere que las caspasas están latentes en la célula porque su concentración es baja para prevenir su «autoactivación» hasta que sea necesaria.

¹ Las caspasas de inicio son las 2,9, 8, 10; las efectoras 3,6,7; el resto modulan la maduración de citocinas).

Por tanto, si consideramos que son requisito necesario para que ocurra la apoptosis hemos de valorar si su expresión se refleja en alguna de las manifestaciones características y, en efecto, mediante el uso de inhibidores específicos se ha visto que intervienen directamente en la desorganización de la estructura celular:

- Rompen la membrana nuclear tras destruir las láminas, lo que contribuye a la condensación de la cromatina.
- Dañan los filamentos de actina.
- Activan DNAsas específicas que fragmentan el ADN a nivel internucleosomal

El resultado final de la activación de las caspasas refleja un proceso perfectamente planificado:

- Se eliminan los contactos con las células vecinas
- Colapso del citoesqueleto
- Se bloquea la replicación del ADN y su reparación
- Desaparece la estructura nuclear
- El ADN se degrada de forma eficaz
- La membrana burbujea
- Se forman los cuerpos apoptóticos

Varias proteínas víricas y celulares pueden actuar como inhibidores de las caspasas. Las células contienen, por ejemplo, proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que pueden inhibir caspasas activadas. Las neuronas, por ejemplo contienen típicamente estas proteínas para protegerlas de la apoptosis prematura.

MECANISMOS REGULADORES

Retomando la pregunta que nos planteábamos, y conociendo que la cascada enzimática regulada por las caspasas representa el principal mecanismo de destrucción vía apoptosis. ¿Qué es lo que la desencadena?

La respuesta no está clara. En lo que sí se coincide es en la existencia de dos vías fundamentales que, por rutas diferentes controlarían la activación de esta maquinaria central: **la vía extrínseca o mediada por receptores** y **la vía intrínseca o mitocondrial**. [Vermeulen 2003, Wang 2003, Cory 2003].

En la **vía extrínseca** los receptores para las señales de muerte

se localizan en la membrana plasmática y son activados por ligandos extracelulares. Receptores típicos son FAS (también llamado apo1 o CD 95) y TNFR-1 (o Receptor del Factor de Necrosis Tumoral-1). Estos receptores presentan un dominio citoplásmico característico llamado «**dominio de muerte**» o **DD** al que se fijan unas proteínas adaptadoras que a su vez se fijan a las **caspasas de inicio**, encargadas de activar a las **caspasas ejecutoras**.

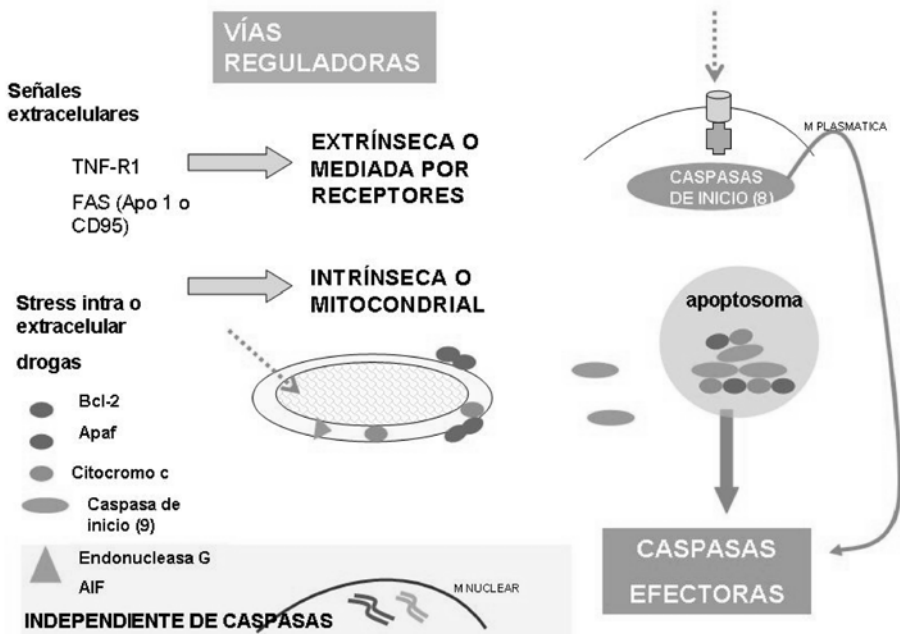
La **vía intrínseca o mitocondrial** se activa por una gran cantidad de estímulos de stress tanto intra como extracelulares, incluyendo el stress oxidativo y el tratamiento con drogas citotóxicas. En la células «sanas» la membrana mitocondrial externa expresa la proteína antiapoptótica **bcl-2** que se fija a una proteína llamada Apaf (apoptotic protein activating factor1). La señal de apoptosis destruye la unión bcl-2 /Apaf1 y provoca liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol, donde se une al Apaf 1, y de otras proteínas proapoptóticas como la Smac diablo o los AIF (factores inducidos por la apoptosis). Esto desencadena la formación de una estructura llamada **apoptosoma**, que contienen citocromo c, Apaf 1 y **procaspasa 9** que es la **caspasa de inicio** del apoptosoma. Su activación conduce a la activación de las **caspasas efectoras**. Las proteínas de la vía intrínseca pueden ser moduladas por oncogenes.

Proteínas mitocondriales en las vías de señalización de apoptosis

Son varias las proteínas que, residiendo normalmente en el espacio intermembrana de la mitocondria, son liberadas durante la apoptosis y desencadenan las cascadas de señales apoptóticas. Podemos dividir las en dos grandes grupos:

- Citocromo c, Smac/DIABLO y HTr A₂/OMI, que **activan la vía dependiente de caspasas**. El citocromo c desencadena la activación de la caspasa 9 a través de la formación de apoptosomas. Smac/DIABLO y HtrA₂/ Omi se fijan a inhibidores de las caspasas, previniendo así la neutralización intracelular de las caspasas activas.
- Endonucleasa G y AIF que se translocan al núcleo e inducen degradación de ADN por una vía **independiente de caspasas**.

PROGRAMA DE MUERTE



Esquema original que recoge las principales vías reguladoras de la apoptosis, descritas en el texto.

REGULACIÓN GÉNICA

El primer gen apoptótico clonado fue **bcl-2**, que demostró ser un oncogen que impide la apoptosis celular. Las proteínas codificadas por el gen *bcl-2* regulan la actividad de la cadena de caspasas. En respuesta al stress, las proteínas de la familia *bcl-2* se agrupan en torno a las membranas intracelulares (sobre todo la mitocondrial, aunque cada vez está recibiendo más interés el retículo endoplásmico) para «decidir» qué células van a morir.

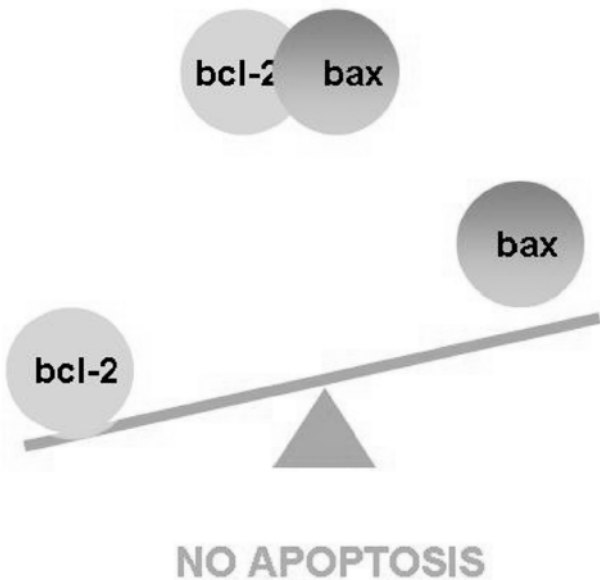
La familia de proteínas sintetizadas a partir del gen *bcl-2* incluye proteínas antiapoptóticas y proteínas proapoptóticas.

- Proteínas proapoptóticas: Bcl-2 y Bcl-XL.
- Proteínas antiapoptóticas: Bax, Bad, Bid.

Estas proteínas suelen presentarse formando dímeros, de forma que es el balance adecuado entre las proteínas proapoptóticas y

antiapoptóticas el que regula la entrada en apoptosis. Un exceso de proteínas proapoptóticas desencadena la liberación de citocromo c de la mitocondria y por tanto la puesta en marcha de la vía intrínseca.

La proteína Bcl-2 también actúa como reguladora del ciclo celular, más específicamente de la transición entre quiescencia y proliferación. [Cory, 2003].



Esquema original que refleja el equilibrio en la familia de proteínas Bcl-2 entre los elementos pro y antiapoptóticos.

Hoy se han identificado unos 20 miembros de la familia Bcl-2, en los cuales, si bien la homología entre aminoácidos es escasa, sí suelen conservarse cuatro dominios característicos que se denominan «dominios de homología Bcl-2» o BH. Los dominios BH son esenciales para las interacciones entre las propias proteínas Bcl-2 y para su funcionamiento. [Yin, 1994; Hirotsani, 1999; Chittenden, 1995, Hunter, 1996.

Algunos miembros de la familia presentan, además, un extremo hidrofóbico C-terminal, que parece intervenir dirigiendo a las proteínas Bcl-2 hacia las membranas lipídicas celulares. [Antonsson, 2004].



Estructura secundaria de las proteínas Bcl-2. Contienen hasta 4 dominios altamente conservados, conocidos como dominios de homología Bcl-2 (BH). Algunos miembros de la familia tienen también un extremo hidrofóbico C-terminal (HCD), que parece implicado en dirigir las proteínas hacia las membranas celulares. Modificado de Antonsson B, Mol.Cell. Biochem 2004, 256/257: 141-155.

Se distinguen tres grandes grupos en la familia Bcl-2:

- **proteínas antiapoptóticas:** la mayoría contienen el anclaje C Terminal y los cuatro dominios BH, como Bcl-2 y BclxL, aunque difieren en su localización intracelular. Así, Bcl-2 se encuentra exclusivamente en las membranas celulares, incluyendo la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear [Krajewski, 1993], mientras que BclXL se localiza además como forma soluble en el citosol [Hsu 1997] y se ha descrito su translocación desde el citosol a la mitocondria durante la apoptosis. [Liston 2003];
- **proteínas proapoptóticas:** Esta subfamilia puede dividirse a su vez en dos grupos, las proteínas multidominio que incluirían a Bax, Bak y Bok y las «BH3 only», que contienen unos 10 miembros.

Antiapoptóticas	Multidominio	BH3 only
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-XL	Bak	Bad
Bcl-w	Bok	Bim/Bod
A1	Bcl-XS	Bik/Nbk
DIVA/BOO	Bcl-rambo	Hrk
NR-13		Blk
		Bmf
		Nix
		PUMA
		Noxa
		BNip3

No se conoce completamente cuál es el mecanismo de acción de las proteínas de la familia bcl-2, sin embargo, hay evidencias que las implican en la regulación de la formación de poros en la membrana mitocondrial.

Tanto las proteínas antiapoptóticas como las multidominio del grupo de las proapoptóticas tienen in vitro actividad formadora de canales en membranas lipídicas artificiales [Antonsson, 1997]. Las antiapoptóticas sólo la presentan a pH bajo, inferior a 5.5 [Schlesinger, 1997; Minn, 1997] lo que ha planteado la cuestión de si las tendrán también en condiciones fisiológicas, mientras que las multidominio sí tienen actividad formadora de canales a pH neutro, si bien se potencia a pH más bajo.

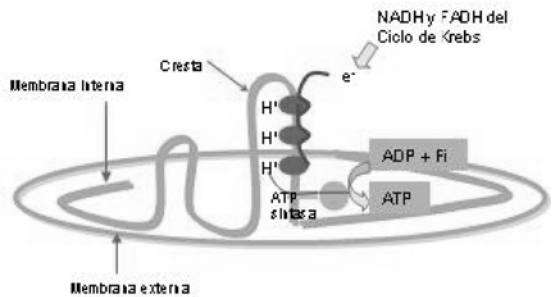
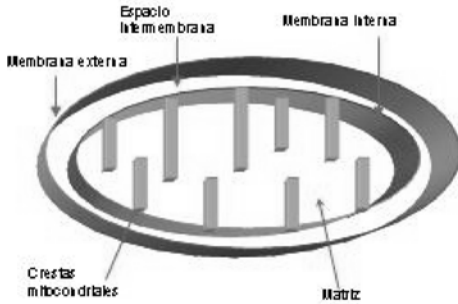
En cuanto a bax, su actividad formadora de canales es compleja. Los canales formados por los oligómeros de Bax en membranas artificiales presentan varios niveles de conductancia, son sensibles a pH, ligeramente selectivos para cationes e insensibles para Ca^{2+} . [Antonsson, 1997, Schlesinger, 1997]. La oligomerización parece requisito imprescindible para la formación de canales de elevada conductancia que permitan el paso de grandes moléculas como el citocromo c. Estos oligómeros tienen la capacidad de dimerizar formando a su vez oligómeros de 160 kDa, que se corresponderían con los tetrámeros y octámeros de bax.

El **oncogen p53** tiene también un papel en la expresión de genes que conducen a la apoptosis. Como describimos al hablar de la regulación del ciclo celular, p53 es responsable de la detención del mismo si existe daño en el ADN. La detención se consigue mediante la activación de p21. Si el daño es irreparable, p53 conduce a la célula hacia apoptosis. ¿Cómo? Una vez activado (por daño al ADN, stress, agentes oncógenos...), el oncogen p53 induce la expresión de Bax, alterando el equilibrio entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. El exceso de bax provoca liberación de citocromo c, que se une al Apaf activando la vía mitocondrial.

MITOCONDRIA Y MUERTE CELULAR

La mitocondria consta de dos membranas, interna y externa, que permiten la existencia de un gradiente electroquímico ($\Delta\Psi_m$) en condiciones normales a lo largo de la membrana interna. Dicho gradiente es el resultado del eflujo de hidrogeniones (H^+) desde la matriz

al espacio intermembrana gracias al funcionamiento de la cadena respiratoria en la membrana interna. El desequilibrio en la concentración de hidrogeniones da como resultado unos gradientes de pH y voltaje a lo largo de la membrana.

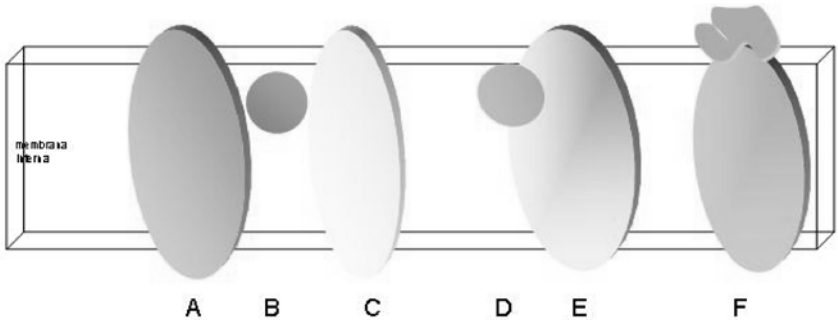


Estructura mitocondrial y detalle de la estructura de las crestas de la membrana interna en las que se sitúa la cadena respiratoria. Esquemas originales.

La membrana interna, que forma crestas, contiene los componentes moleculares de la cadena de transporte electrónico. El citocromo c es uno de los componentes de esta cadena respiratoria y, como tal, está implicado en la creación del potencial de membrana mitocondrial, la principal fuerza impulsora para la formación de ATP. Específicamente interviene transportando electrones entre los complejos III (citocromo c reductasa) y IV (citocromo c oxidasa). El Apo citocromo c es codificado por un gen nuclear y sintetizado por los ribosomas citoplásmicos en una configuración desplegada que permite la recepción del grupo hem [Crompton, 1999]. El enlace covalente de ese grupo hem estimula un cambio conformacional y el holo-citocromo c asume, subsecuentemente, su papel funcional como componente de la cadena respiratoria.

La primera referencia a la mitocondria como elemento esencial en la apoptosis fue aportada por Newmeyer [Newmeyer, 1994] utilizando un modelo «cell-free». A continuación, y utilizando extractos celulares Liu y colaboradores demostraron que el citocromo c podía activar la cascada de señales de apoptosis in vitro [Liu 1996].

La disfunción mitocondrial en la apoptosis parece ser, de modo principal, el resultado de una permeabilización específica de la membrana mitocondrial externa a grandes moléculas incluyendo al citocromo c. La pérdida de citocromo c desde la cara externa de la membrana mitocondrial interna resulta, al menos en una alteración de la respiración mitocondrial, bloqueando, de hecho el transporte de electrones entre el complejo III (citocromo c reductasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa).



Cadena respiratoria mitocondrial .A: NADH reductasa; B: ubiquinona; C: Citocromo reductasa; D: Citocromo c; E: Citocromo oxidasa; F: ATP sintetasa. (esquema original).

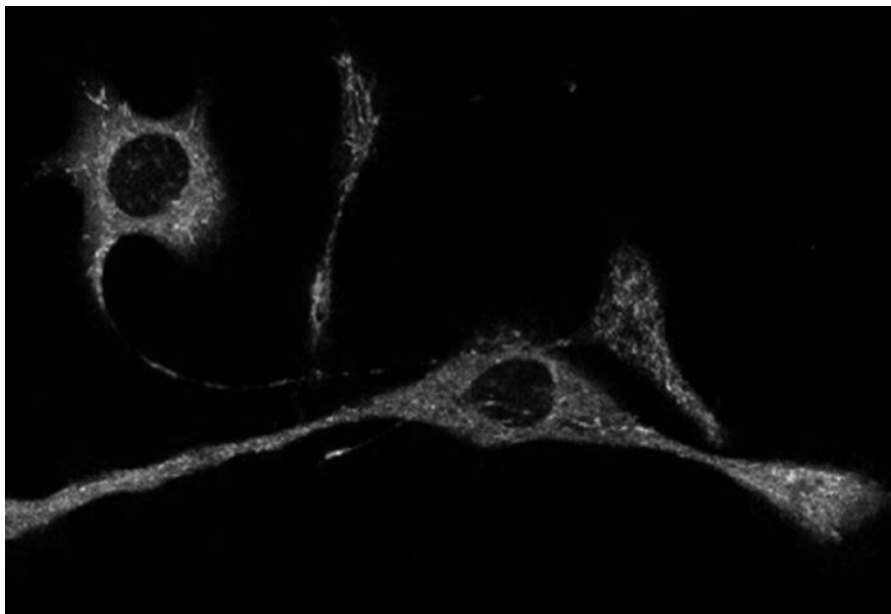
En la apoptosis, la mitocondria desempeña dos papeles primordiales:

- Proporciona energía en forma de ATP, lo cual es fundamental para la célula que muere vía apoptosis.
- Libera proteínas proapoptóticas que normalmente están secuestradas en el espacio intermembrana, hacia el citosol donde desencadenan la cascada de señales apoptóticas.

Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y apoptosis

El potencial de membrana mitocondrial (MMP), « Ψ_m , puede controlar la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y

regular la liberación de citocromo c y otras proteínas [Robertson, 2000]. Cuando las mitocondrias pierden su $\Delta\Psi_m$ se hinchan y liberan las proteínas intermembrana (proteínas IMs). La hiperpolarización, además, se ha relacionado recientemente con los cambios apoptóticos subsiguientes, a través de las alteraciones que se provocan en la cadena de transporte electrónico [Iijima, 2003]. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado en los últimos meses la capacidad del etopósido para inducir alteraciones en el $\Delta\Psi_m$, como primer paso en la disfunción mitocondrial. Hemos descrito la aparición concomitante de un aumento en la $[Ca^{++}]_i$, que se considera inductor de la «permeabilidad mitocondrial transitoria» (MPT o mitochondrial permeability transition), en la apoptosis inducida por etopósido.



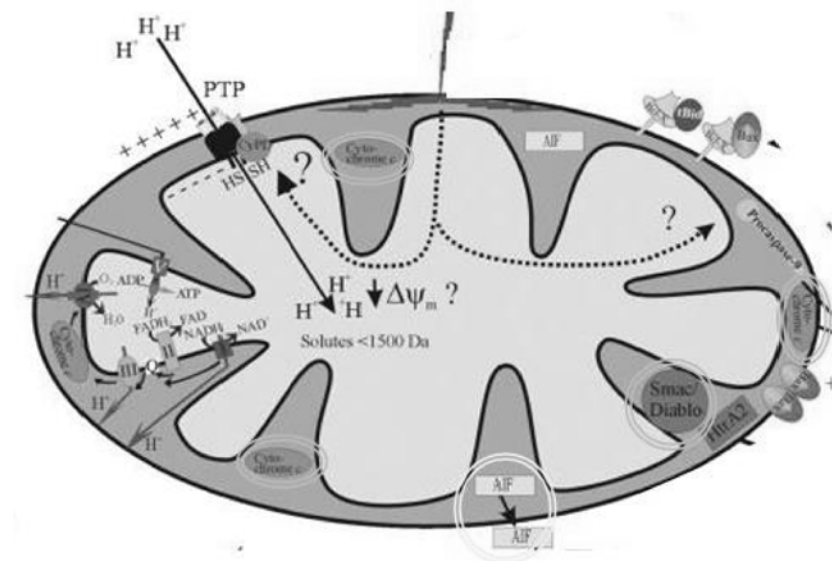
Marcaje celular realizado en nuestro laboratorio sobre células PC3 para el estudio de las variaciones en el potencial de membrana mitocondrial tras la inducción de apoptosis por etopósido. En rojo, mitocondrias que conservan el potencial de membrana, $\Delta\Psi_m$.

En verde, células cuyas mitocondrias han perdido el $\Delta\Psi_m$. Marcaje con JC1.

Inicialmente se sugirió que la inducción del MPT que daba como resultado la apertura de poros transitorios («transition pores» o PPT) y pérdida del gradiente $\Delta\Psi_m$, estimulaba la liberación de citocromo

c, efecto que parecía bloquearse con inhibidores del MPT como la ciclosporina A. Los poros transitorios, PTP, son estructuras compuestas por proteínas tanto de la membrana mitocondrial externa (VDAC o canal aniónico voltaje dependiente) como de la interna (proteína translocadora de adenina) que permiten la formación de puntos de contacto entre ambas membranas. La apertura de estos canales de forma calcio- dependiente resulta en permeabilización de la membrana interna a moléculas de hasta 1500 Da, con alteraciones del MPT y pérdida del $\Delta\Psi_m$, con desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, hinchazón mitocondrial, y rotura de la membrana externa con el resultado de la liberación inespecífica de proteínas, incluyendo al citocromo c [Marzo, 1998; Crompton, 1999].

Sin embargo, estudios posteriores sugieren que, si bien este mecanismo es, muy probablemente, causante de la liberación de citocromo c, no sería el único mecanismo [Gogvadze, 2001] y la liberación del citocromo c podría ser resultado de otros mecanismos calcio dependientes o independientes, habiéndose descrito incluso la liberación de citocromo c en mitocondrias aisladas en respuesta a etopósido, incluso en presencia de un bloqueante del MPT como es el EGTA. [Robertson., 2000a].



Representación esquemática de la mitocondria y de las proteínas mitocondriales implicadas en la regulación de apoptosis. Modificado de: Lacen. A. Bioessays. 2003 Sep;25(9):888-96.

Alternativamente, puede ocurrir que la liberación de citocromo c implique una permeabilización de la membrana mitocondrial externa regulada por las proteínas proapoptóticas de la familia bcl-2 Bax o Bid de las que se sabe que inducen liberación de citocromo c. [Robertson, 2000]

Activación de la vía mitocondrial dependiente de caspasas

El citocromo c se encuentra en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, en un 80-90 % en las crestas, donde realiza su función en la cadena respiratoria. [Frey, 2000].

Durante la apoptosis, el citocromo c se libera al citosol, en un proceso rápido, que parece constar de dos pasos, en primer lugar se desprende de la membrana interna y posteriormente, la proteína soluble es liberada tras la permeabilización de la membrana externa. Posteriormente, se produce una reestructuración de las crestas que parece estar relacionada con t Bid [Scorrano, 2002].

En el citoplasma, el citocromo c se fija a Apaf-1, una proteína citosólica que contiene un dominio reclutador de caspasas (CARD). Como resultado, se produce el reclutamiento de pro-caspasa 9 y la formación de una estructura denominada apoptosoma. Una vez fijada al complejo, la procaspasa 9 se autoactiva proteolíticamente, y desencadena la cascada de ejecución, activando a las caspasas ejecutoras como las caspasas 3 y 7. Estas caspasas actúan sobre los diferentes sustratos y desencadenan los cambios morfológicos característicos de la apoptosis, como describimos en apartados previos.

Smac/DIABLO es una proteína de 25 kDa codificada en el núcleo, sintetizada en el citosol e importada a la mitocondria, donde madura formando multímeros. La forma madura al ser liberada al citoplasma es capaz de fijarse a las caspasas y también a las IAPs, proteínas inhibidoras de apoptosis.

Las IAPs son proteínas capaces de fijarse tanto a las procaspasas como a las caspasas activas inhibiendo, respectivamente, su activación o su actividad [Verhagen, 2000, Du, 2000, Liston, 2003] y contienen unos dominios BIR, repeticiones de fragmentos baculovirales IAP, que posibilitan su interacción con las caspasas activas y con Smac/DIABLO [Srinivasula, 2001].

Otra proteína capaz de inhibir a las IAPs es HtrA2/Omi. una proteína que se localiza en el retículo endoplásmico, núcleo y en la

mitocondria. Se sintetiza en forma de precursor y la forma madura se libera de la mitocondria cuando las células entran en apoptosis. Principalmente se ha descrito en apoptosis relacionada con Fas, y actúa fijándose e inactivando a las IAPs de forma similar a Smac/DIABLO [van Loo, 2002].

Activación de la vía mitocondrial independiente de caspasas

Las proteínas liberadas desde el espacio intermembrana no sólo intervienen en la activación de la apoptosis, dependiente de caspasas, sino que actúan también activando vías, menos conocidas, independientes de la activación de caspasas. Destacaremos a la Endonucleasa G y al AIF (Apoptosis Inducing factor).

La **endonucleasa G** es una proteína de 30 kDa codificada en el núcleo y sintetizada en el citosol, y posteriormente importada a la mitocondria donde se produce la maduración de la proteína. Durante la apoptosis, la proteína madura se libera desde la mitocondria [Candé 2004] al citosol y finalmente se transloca al núcleo.

En la apoptosis clásica, el ADN es fragmentado por una endonucleasa denominada CAD («caspase-activated DNAsa» o DNAsa activada por caspasas) En las células no apoptóticas, la CAD va unida a un inhibidor (ICAD) y forma parte de un complejo denominado DFF («DNA fragmenting factor» o factor fragmentador de ADN). Durante la apoptosis, la caspasa 3 activa fragmenta al ICAD y produce la liberación de CAD activa, que es suficiente para inducir la fragmentación del ADN [Enari, 1999; Candé, 2004].

Al contrario que ocurre con la CAD, la endonucleasa G no necesita activación de caspasas y, una vez translocada al núcleo la proteína madura, produce la fragmentación del ADN de forma independiente de caspasas. [Griffiths, 2000, van Loo, 2001]. Se ha identificado recientemente un gen en *C. elegans*, *cps-6*, con grandes similitudes con la endonucleasas G mamífera, cuyas mutaciones afectan a la degradación del ADN y al desarrollo del nematodo. *Cps-6* es la primera proteína mitocondrial que se ha demostrado implicada en la apoptosis en *C. elegans*, lo que refuerza la importancia de la mitocondria en la señalización de apoptosis. [Miramar, 2001; Parrish, 2001].

El **factor inductor de apoptosis (AIF)** es una proteína normalmente residente en el espacio intermembrana y se libera al citosol

durante la apoptosis. Una vez en el citosol, la proteína se transloca al núcleo donde se ha demostrado que induce fragmentación del ADN a gran escala y condensación de la cromatina. [Susin, 1999, Antonsson, 2004, Candé, 2004].

El AIF no tiene actividad DNAsa detectable y el mecanismo por el cual induce la fragmentación de ADN y la condensación de la cromatina no está claro, ni si interacciona con otras proteínas, como las nucleasas, o las activa. [Candé, 2004].

REFLEXIÓN FINAL

A lo largo de la exposición hemos revisado aquellos aspectos de la apoptosis que suponen un avance en el conocimiento de la misma. En efecto, la comprensión de los factores moduladores, de la maquinaria intracelular, de los mecanismos reguladores y, finalmente del papel de las mitocondrias nos aproximan a un fenómeno que constituye el eje central de una serie de enfermedades en las que la sobreexpresión o la inhibición de la muerte celular programada es responsable de las manifestaciones clínicas. Hemos intentado, aún a sabiendas de la acotación impuesta por el tiempo y el espacio, acercarnos a comprender la muerte celular que es, sin duda, junto con el ciclo celular, uno de los grandes paradigmas de la biología celular y molecular. Es así como la investigación básica aparece proporciona a la patología un soporte necesario para la comprensión de la enfermedad, haciendo realidad en parte, las palabras proféticas de Kölliker. Esperamos de la audiencia o del lector que hayamos satisfecho su interés por el tema o cuando menos suscitado la curiosidad científica. En síntesis, comprender la muerte celular continúa siendo un reto, su dominio a través de la terapéutica permitirá en un futuro, que esperamos no sea muy lejano, curar o aliviar enfermedades ante las cuales los actuales arsenales terapéuticos se muestran ineficaces o tienen solamente un papel paliativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aportaciones propias

«Mitochondria and cell death». Vilches, J.; Salido, M. Invited Lecture. *Histol. Histopath* 2005, suppl. 1 S58-59.

- «Neuropeptides, Apoptosis and Ion changes in Prostate Cancer. Methods of study and recent developments». Vilches, J.; Salido, M.; Fernández-Segura, E.; Roomans, G.M. *Histol. Histopathol.* 2004; 19: 951-961.
- «Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis». Salido, M.; Vilches, J.; Roomans, G.M. *Cell Biol.Int.* 2004, 28 (5): 397-402.
- «Mitochondrial role in etoposide induced apoptosis of human prostatic cancer cells». Navarro, A.; Salido, M.; Serrano, M.J.; Vilches, J. *Free Radical Biol. Med.* 2004, 36, supp 1: 166.
- «Neuropeptides bombesin and calcitonin inhibit apoptosis-related elemental changes in prostate carcinoma cell lines». Salido, M.; Vilches, J.; López, A.; Roomans, G.M. *Cancer* 2002; 94: 368-377.
- «Morphological observation and x-ray microanalysis on apoptotic cell death in an androgen sensitive prostate cancer cell line». Salido, M.; Vilches, J.; López, A.; Roomans, G.M. *Biol. Cell* 2001, 93: 403- 404.
- «Alterations of cell volume and apoptosis regulation: a SEM and x-ray microanalytical study». Vilches, J.; Salido, M.; López, A.; Roomans, G.M. *Biol. Cell* 2001, 93: 405-406.
- «Neuropeptides bombesin and calcitonin induce resistance to etoposide induced apoptosis in prostate cancer cells». Salido, M.; Vilches, J.; López, A. *Histol.Histopathol.* 2000, 15: 729-738.
- «Etoposide sensitivity of human prostatic cancer cell lines PC-3, Du 145, LNCaP». Salido, M.; Larrán, J.; Vilches, J.; López, A.; Aparicio, J. *Histol.Histopathol.* 1999, 14: 125-134.
- SALIDO, M.; LÓPEZ, A.; APARICIO, J.; LARRÁN, J.; VILCHES, J. (1996): «Characterization of apoptosis in prostatic androgen independent cell lines». *Int. J. Dev. Biol.* supp 1, 191-192.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ANTONSSON, B.; CONTI, F.; CIAVATTA, A.; MONTESSUIT, S.; LEWIS, S.; MARTINOU, I.; BERNASCONI, L. *et al.*: «Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2». *Science* 1997, 277: 370-372.
- ANTONSSON, B.: «Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signalling pathways». *Mol.Cell. Biochem* 2004, 256/257: 141-155.
- BORTNER, C.D.; HUGHES, F.M. JR.; CIDLOWSKI, J.A.: «A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis». *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 32436-32442.
- CANDÉ, C.; VAHSEN, N.; GARRIDO, C.; KROEMER, G.: «Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all». *Cell Death Differen.* 2004, 11: 591-595
- CHITTENDEN, T.; FLEMINGTON, C.; HOUGHTON, A.B.; EBB, R.G.; GALLO, G.J.; ELANGOVAN, B.; CHINNADURAI, G.; LUTZ, R.J.: «A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions». *EMBO J* 1995, 14: 5589-5596.
- CORY, S.; HUANG, D.C.; ADAMS, J.M.: «The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis». *Oncogene.* 2003 Nov 24; 22(53): 8590-607.

- CROMPTON, M.: «The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death». *Biochem. J.* 1999, 341: 233-249.
- DALLAPORTA, B.; HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; LAROCLETTE, N.; BRENNER, C.; MARZO, I., *et al.*: «Potassium leakage during the apoptotic degradation phase». *J. Immunol.* 1998, 160, 5605-15.
- DALLAPORTA, B.; MARCHETTI, P.; DE PABLO, M.A.; MAISSE, C.; DUC, H.T.; METIVIER, D.; ZAMZAMI, N., *et al.* (1999): «Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis». *J. Immunol.*, 162, 6534-42.
- DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J.: «A decade of caspases». *Oncogene.* 2003 Nov 24; 22(53): 8543-67
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X.: «Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition». *Cell* 2000, 102: 33-42.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S.: «A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, its inhibitor ICAD». *Nature*, 1998, 393: 396.
- FREY, T.G.; MANNELLA, C.A.: «The internal structure of mitochondria». *Trends Biochem Sci* 2000, 25: 319-324.
- GOGVADZE, V.; ROBERTSON, J.D.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.: «Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺ independent mechanisms that are regulated by Bax». *J Biol. Chem.* 2001, 276: 19066-19071.
- GRIFFITHS, E.J.: «Mitochondria, potential role in cell life and death». *Cardio-vasc. Res.* 2000, 46: 24-27.
- HIROTANI, M.; ZHANG, Y.; FUJITA, N.; NAITO, M.; TSURUO, T.: «NH₂-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis». *J Biol Chem* 274: 20415-20420,
- HSU, Y.T.; WOLTER, K.G.; YOULE, R.J.: «Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis». *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 94: 3668-3672.
- HUGHES, F.M. JR.; CIDLOWSKI, J.A.: «Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo». *Adv. Enzyme Regul.* 1999, 39, 157-71.
- HUNTER, J.J.; PARSLAW, T.G.: «A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis». *J Biol Chem.* 1996, 271: 8521-8524.
- IJIMA, T.; MISHIMA, T.; AKAGAWA, K.; IWAO, Y.: «Mitochondrial hyperpolarization after transient oxygen-glucose deprivation and subsequent apoptosis in cultured rat hippocampal neurons». *Brain Res.* 2003, 993, 140-145.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R.: «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics». *Br J Cancer.* 1972 Aug; 26(4): 239-57.
- KRAJEWSKI, S.; TANAKA, S.; TAKAYAMA, S.; SCHIBLER, M.J.; FENTON, W.; REED, J.C.: «Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes». *Cancer Res* 1993, 53: 4701-4714.
- LAWEN, A.: «Apoptosis an introduction». *BioEssays* 2003, 25: 888-896.
- LISTON, P.; FONG, W.G.; KORNELUK, R.G.: «The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl-2». *Oncogene* 2003, 22: 8568-8580.
- LIU, X.; KIM, C.N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X.: «Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c». *Cell* 1996, 86: 147-157.

- MARZO, I.; BRENNER, C.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; BEUTNER, G.; BRDICZKA, D.; REMY, R.; XIE, Z.H.; REED, J.C.; KROEMER, G.: «The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins». *J Exp Med* 1998, 187: 1261-1271.
- MINN, A.J.; VÉLEZ, P.; SCHENDEL, S.L.; LIANG, H.; MUCHMORE, S.W.; FESIK, S.W.; FILL, M.; THOMPSON, C.B.: «Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes». *Nature* 1997, 385: 353-357.
- MIRAMAR, M.D.; COSTANTINI, P.; RAVAGNAN, L.; SARAIVA, L.M.; HAOUZI, D.; BROTHERS, G.; PENNINGER, J.M.; PELEATO, M.L.; KROEMER, G.; SUSIN, S.A.: «NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor». *J Biol. Chem.* 2001, 276: 16391-16398.
- MONTAGUE, J.W.; BORTNER, C.D.; HUGHES, F.M. JR.; CIDLOWSKI, J.A.: «A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis». *Steroids* 1999, 64, 563-69.
- NEWMAYER, D.D.; FARSCHE, D.M.; REED, J.C.: «Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: Inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria». *Cell* 1994, 79: 353-364.
- PARRISH, J.; LI, L.; KLOTZ, K.; LEDWICH, D.; WANG, X.; XUE, D.: «Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*». *Nature* 2001, 412: 90-94.
- ROBERTSON, J.D.; ORRENIUS, S.: «Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals». *Crit. Rev. Toxicol.* 2000, 30, 609-627.
- ROBERTSON, J.D.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.: «Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide». *J. Biol. Chem.* 2000a, 275, 32438-32443.
- SCHLESINGER, P.H.; GROSS, A.; YIN, X.M.; YAMAMOTO, K.; SAITO, M.; WAKSMAN, G.; KORSMEYER, S.J.: «Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2». *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 11357-11362.
- SCORRANO, L.; ASHIYA, M.; BUTTLE, K.; WEILER, S.; OAKES, S.A.; MANNELLA, C.A.; KORSMEYER, S.J.: «A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis». *Dev Cell* 2002, 2: 55-67.
- SRINIVASULA, S.M.; HEGDE, R.; SALEH, A.; DATTA, P.; SHIOZAKI, E.; CHAI, J.; LEE, R.A.; ROBBINS, P.D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; SHI, Y.; Alnemri, E.S.: «A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis». *Nature* 2001, 410: 112-116.
- SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B.E.; BROTHERS, G.M.; MANGION, J. *et al.*: «Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor». *Nature* 1999, 397: 441-446.
- VAN LOO, G.: «The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity». *Cell Death Differen.* 2002, 9:20-26.
- VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L.: «Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins». *Cell* 2000, 102: 43-53.
- VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTALE, D.R.: «Cell Cycle and apoptosis». *Cell Prolif.*, 2003; 36: 165-175.

- WANG, S; EL-DEIRY, W.S.: «TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors». *Oncogene*. 2003, Nov 24; 22(53): 8628-33.
- YIN, X.M.; OLTVAI, Z.N.; KORSMEYER, S.J.: «BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax». *Nature* 1994, 369: 321-323.

INTERVENCIONES

Prof. Campos Muñoz

Quiero intervenir, en primer lugar, para felicitar al Prof. Vilches Troya y darle la más cordial bienvenida a la Real Academia Nacional de Medicina, que también es su casa, y felicitarle por la excelente exposición científica que ha hecho sobre un tema que a todos nos interesa y que es realmente muy complejo. Simplemente porque es un experto en este tema, porque lo conoce muy bien, porque tiene trabajos publicados en relación a los temas que nos ha comentado hoy aquí y porque yo tengo la suerte y la fortuna de conocer, no solamente por haberlos leído, sino por haberlo discutido y comentado en varias ocasiones con el Prof. Vilches, es un tema que realmente me interesa mucho y me gustaría escuchar su opinión por si hay novedades al respecto; conocemos mucho de la apoptosis en todos sus mecanismos moleculares, el papel en relación con la membrana, la mitocondria, los genes; conocemos su participación en distintas enfermedades. Pero a mí me parece extraordinariamente importante la existencia de la apoptosis en el proceso de diferenciación celular ortotípico, ordinario, normal, porque me parece que eso nos marca una pauta en la que quizás yo no percibo avances significativos; por ejemplo, cuando se ha comentado la importancia que tiene la apoptosis en la individualización de los dedos o en cualquier otra remodelación del organismo en el desarrollo embrionario y fetal.

¿Tiene esto alguna relación con la información posicional?, es decir, la importancia de la posición en el embrión y en el feto de una célula para que se comporte y diferencie de una determinada manera. ¿Es importante la información posicional para desencadenar la apoptosis, y en qué medida y qué factores lo regulan? Creo que muchas veces conocemos mucho de la intimidad de la apoptosis, pero conocemos muy poco de los factores normales que acaban desencadenándola. Si conociésemos ese tramo, paso que va de la

información posicional al porqué esa célula está en ese lugar, en ese momento, en ese sitio, desencadena la apoptosis, estaríamos muy cerca de poder avanzar en esa última esperanza que nos ha transmitido el Prof. Vilches de hacer de la apoptosis no solamente el mecanismo biológico que conocemos, sino un instrumento de carácter terapéutico que podamos inducir o inhibir en determinadas circunstancias y en relación con determinadas enfermedades.

Quisiera ver qué información reciente hay sobre la correlación entre la posición de la célula en el embrión, en el desarrollo fetal, en la configuración de los tejidos y la aparición de la señal que indica a esa célula que tiene que morir. Eso para mí es un punto clave y creo que evidentemente sería fundamental conocer esa interrelación.

Prof. González Barón

La ciencia básica ilustra a la clínica, indudablemente. Le voy a dar unos cuantos argumentos de cómo también la clínica ilustra a la ciencia básica. En 1974 nosotros tratábamos muchísimas leucemias, y una en particular, que era la leucemia linfoblástica linfoide crónica; entonces ya nos dábamos cuenta que aquello no tenía mucho que ver con el resto de las otras enfermedades linfoproliferativas, y empezamos a llamarla enfermedad linfoacumulativa para distinguirlas; al final, el enfermo se muere por acumulación de linfocitos maduros.

En 1984 ya sabíamos que había un cromosoma que era portador de un gen, el BCL2, que era el responsable de que los linfocitos no se murieran; hoy sabemos muchas más cosas, tal y como nos ha ilustrado en la conferencia. Otro aspecto que la clínica ilustra a la ciencia básica es una serie de trabajos que estamos haciendo con el Prof. Cuezva, del Instituto de Biología Molecular Severo Ochoa; estamos estudiando alteraciones de la inspección génica de la mitocondria en el estrés celular y hemos demostrado y está publicado recientemente cómo existe una relación directa entre el pronóstico de algunos cánceres de mama, que por sí mismos ya sabemos que tienen mal pronóstico, porque clínicamente los factores clásicos clínicos como el número de ganglios axilares, la diferenciación, el grado de alteración celular..., y esas alteraciones genéticas mitocondriales, y hemos encontrado que alteraciones proteicas de la alteración

génica de las mitocondrias tienen un papel relevante de aplicación práctica en la clínica diaria.

Prof.^a Maroto Vela

Me veo un poco obligada a hablar hoy ante mis compañeros por mi condición doble, Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Medicina y Presidente de la Real Academia de Medicina de Granada. Quiero transmitir mi gran satisfacción, mi gran orgullo y mi gran felicidad por dos cosas: porque sigo comprobando cómo esta Real Academia sigue teniendo sus puertas abiertas y los brazos extendidos a las Reales Academias de Medicina de Distrito y comprobar el grado de validez científica de los Académicos de otras Reales Academias de Medicina, en este caso del Prof. Vilches, Presidente de la Real Academia de Medicina de Cádiz. He de felicitarle por su conferencia, aunque esté muy alejada de mi campo de trabajo, pero sobre todo por una frase que ha dicho nada más empezar su charla: «debe tenerse en cuenta y potenciar las redes de Academias». Realmente creo que la única forma de que avancemos un poco en el campo de la ciencia, que las Academias realmente sean, como dice el Prof. Durán Sacristán, al que admiro profundamente, esos foros donde de verdad se debaten ideas al más alto nivel entre colegas, y en este caso han sido colegas no de un solo sitio, sino de otros sitios, lo cual nos universaliza y hace que cada vez seamos más abiertos y más científicos.

Prof. Piédrola Angulo

Quisiera felicitar, en primer lugar, al Prof. Vilches, Presidente de una Academia hermana, no solamente por estar aquí hoy, sino por la Academia hermana de Cádiz que tantas relaciones tenemos con ellos en la Academia de Granada y en todas las Academias de Andalucía, y expresarle a él y al Prof. Campos que durante la disertación que ambos han hecho me he acordado de su maestro, que hubiera estado aquí disfrutando mucho con todos nosotros, el Prof. Gómez, Académico de una gran valía dentro de la Real Academia de Medicina de Cádiz, y que su paso por Madrid fue perfectamente conocido.

El tema de la apoptosis nos interesa absolutamente a todos, y sólo con dos ejemplos que me han venido a ayudar en la preparación de una conferencia próxima que tengo con respecto a las enfermedades infecciosas. Hay alguna de las enfermedades infecciosas en las que la apoptosis juega un papel fundamental, y el ejemplo que él ha puesto es el más claro, que es el de la infección VIH y cómo rápidamente y a través de mecanismos también de superantígenos, el virus va a destruir en una pequeñísima cantidad de tiempo una enorme cantidad de linfocitos C. Pero últimamente hay otra serie de estudios que él ha comenzado y que yo voy a estudiar a fondo una vez que tenga el texto, que es el de aquellos virus que inhiben la apoptosis; el ejemplo más claro, y por citarles uno, es el virus rábico, que no le interesa nada la destrucción de las neuronas, porque entonces no podría transmitirse el camino centripeto desde la parte de la mordedura hasta el cerebro; entonces lo que hace es inhibir la apoptosis de las neuronas, tema enormemente interesante también el de los inhibidores. Le felicito cordialmente y hemos tenido una tarde deliciosa con su conferencia.

**EL HOMBRE Y EL MAR:
FITOPLANCTON MARINO Y SALUD PÚBLICA**

***THE MAN AND THE SEA:
MARINE PHYTOPLANCTON AND PUBLIC HEALTH***

Por el Ilmo. Sr. D. JOSÉ MIRA GUTIÉRREZ

Vicepresidente y Académico de Número de la Real Academia
de Medicina y Cirugía de Cádiz

Resumen

La progresiva emergencia a nivel mundial de un fenómeno natural denominado «marea roja», normalmente ignorado, por su excepcionalidad o exotismo, de la formación sanitaria y médica, es un riesgo ya acaecido en España y en Europa, con cierta recurrencia y bajo algunas de las formas etiológicas y clínicas que antes nos eran desconocidas. Hoy bajo la denominación convencional de «Harmfull Algal Blooms» (HABs) han dado lugar a una extensa investigación, a una numerosa bibliografía, a una legislación sanitaria casi universal y a una preocupación preventiva de los distintos Estados que toman conciencia de que es un riesgo potencial prácticamente ineludible. En este trabajo se revisan los factores básicos de las HABs, la ecoepidemiología de los mismos, y los cuadros tóxicos producidos por el fitoplancton marino, representado por Dinoflagelados, Diatomeas y Cianobacteria toxigénicas.

Abstract

The progressive, world-wide emergence of the natural phenomenon «red tide» normally ignored because of the exceptionality or exotic nature of its sanitary and medical formation, is a risk already present in Spain and Europe, with a certain repetition and under some of the ethiological and clinical forms which were previously unknown to us. Today under the conventional denomination of «Harmful Algae Blooms» (HABs) they have

given rise to an extensive investigation, to much bibliography and an almost universal sanitary legislation, as well as a preventive preoccupation of the some states which have become aware that this is a potential and practically unavoidable risk. In this work the basic facts of HABs, their eco-epidemiology and the knowledge of toxic syndroms produced by the marine phytoplankton, represented by some Dinoflagellates and Diatomeas, and Cyanobacteria, are reviewed.

INTRODUCCIÓN

La creciente frecuencia con la que en los últimos años se presentan brotes de «mareas rojas» o «blomms algales nocivos» (Harmfull Algal Blooms; HABs) para la salud humana, necesita una justificación plausible, frente al carácter exótico y esporádico de estos fenómenos en el recuerdo histórico de las poblaciones costeras de los distintos océanos, y con más excepcionalidad en los europeos. Algunos factores desencadenantes han sido evaluados positivamente en este fenómeno: el cambio climático con elevación de la temperatura media de mar; el aporte masivo de aguas residuales más o menos depuradas en las costas; la llegada a los estuarios fluviales de aguas dulces cargadas de fosfatos y nitratos de los fertilizantes químicos agrícolas y la importación de quistes en las aguas de lastre de los buques mercantes procedentes de áreas endémicas en sus viajes a aguas indemnes. Y al mismo tiempo que sus causas, debemos estudiar el estado actual del problema y su significación sobre la Salud Pública y los aspectos médicos que de ello se deducen.

Los términos anglosajones «red tide» o «red water», equivalentes al castellano «marea roja», han sido incorporados desde hace bastantes años al léxico de la epidemiología y de la Salud Pública, y cada vez más a los comentarios populares referentes a los riesgos insospechados que asedian al hombre en estos tiempos de alta tecnología, desarrollo económico y social, a expensas de una naturaleza insubordinada, que reclama sus derechos. La «marea roja» define el crecimiento masivo local de algas, bacterias o protozoos del plancton, dando una coloración típica a la superficie de las aguas marinas, en extensión y profundidad más o menos amplia. La coloración no siempre es roja, pues puede ser pardo amarillenta, verde, o de otras tonalidades, dependiendo de la pigmentación del microorganismo responsable. Un pigmento xantofílico, la «peridina», implicado en la fotosíntesis de los dinoflagelados, es el que

proporciona la coloración roja al fenómeno de la «marea roja». Desde nuestra perspectiva, los habitantes planctónicos más representativos a este respecto de Salud Pública, son los dinoflagelados, las diatomeas y las cianobacterias, algunas de cuya especies son capaces de producir y segregar toxinas al medio marino, dando lugar a intoxicaciones letales de peces y circunstancialmente afectando al hombre, individual o colectivamente, a través de la cadena alimentaria.

Un número considerable de micrororganismos del plancton constituyen el «fitoplancton» que se refiere a aquellos organismos capaces de fotosíntesis, representando así a las plantas superiores continentales, cuya función fundamental es la de ser productores primarios de materia orgánica y la de liberar O_2 a la atmósfera, consumiendo CO_2 . El fitoplancton es fotosintético y autotrófico, requiere nitratos y fosfatos y la luz solar. Cuando una serie de circunstancias más o menos identificadas, da lugar a una explosión masiva de una única especie de este fitoplancton, con detrimento del resto de la formula planctónica habitual, se dice que ha tenido lugar un «bloom algal». La «marea roja» es un «bloom algal», pero a diferencia de éste, a veces predecible en el tiempo y espacio por la conjunción de criterios conocidos estadísticamente en los historiales de observación del fenómeno, la «marea roja» es normalmente imprevisible. La terminología más reciente al respecto, «Harmful algal blooms» (HABs), «Floraciones algales nocivas», es más precisa y selectiva desde la perspectiva de la Salud Pública y la Medicina, que el histórico término de «mareas rojas».

En principio, las «mareas rojas» requieren, o prefieren, temperaturas del mar de 20-27° C, ambiente de estuario o baja salinidad, aportes de minerales, quelantes del hierro, cobre, vitaminas B12, B1 y Biotina, mucha materia orgánica y una DBO elevada. Casi todo esto es aportado hoy por efluentes urbanos o por los ríos que transportan muchos de estos factores. La justificación de que estas circunstancias conocidas, y otras inciertas, conduzcan a la proliferación de una única especie del fitoplancton en un momento determinado, se atribuye a la presencia de un factor de crecimiento selectivo de esa especie, a la presencia de telemediadores, tóxicos o no, que inhiben el crecimiento de otros plantonctes, o que la especie que prolifera es productora de toxinas que elimina temporalmente a sus competidores del fitoplancton.

Los dinoflagelados son los agentes más significativos en la toxi-

ciología alimentaria de origen marino. Los dinoflagelados constituyen el segundo elemento en importancia del fitoplancton en el medio oceánico, la mayoría como microorganismos de vida libre, o como epifítico o epizooicos sobre otras algas superiores o animales, respectivamente, o como endozoicos en el interior de animales marinos. Con apariencia de protozoos, son características peculiares la presencia de dos flagelos, situados perpendicularmente, la producción de esporas biflageladas características y el núcleo de tipo «dicarion». Un criterio diferencial en su clasificación es la presencia de una *teca*, *estema* o *coraza* en el Grupo de los «acorazados», y la carencia de esta estructura, en el Grupo de los «desnudos». La teca está compuesta de celulosa, callosa y pectina. Esta teca se muestra generalmente como un poliedro formado por placas soldadas entre si, y con una forma de caja bivalva unida por una sutura ecuatorial. Estas placas suelen estar ornamentadas y perforadas, proporcionando caracteres taxonómicos para su clasificación. Las formas desnudas carecen de esta coraza y sus modalidades. La terminología está basada en la forma ovoide de los dinoflagelados. El polo más aguzado es el *apex*, y el opuesto el *antapex*. La valva del *apex* es el *epicono* o *episoma* y la del *antapex*, el *hipocono* o *hiposoma*. Un surco transversal ecuatorial o cintura divide al dinoflagelado en dos mitades. Un segundo surco, longitudinal, perpendicular al de «cintura», se extiende desde ésta hasta el *antapex*. En el cruce de estos dos surcos se implantan dos flagelos, uno de cintura, que no emerge y otro, el del surco longitudinal, que rebasa libremente el *antapex*. En el citoplasma más externo, el ectoplasma, se encuentran los cloroplastos, de color verde amarillento, que hace que estos organismos unicelulares se clasifiquen entre las algas y no entre los protozoos donde han estado ubicados mucho tiempo. Como formas de transición «alga-protozoo» se clasifican como Phytoflagelata. En condiciones normales de luminosidad se comportan como fotosintéticos; en condiciones de profundidad puede comportarse como predadores fagocitarios, e incluso nutrirse por mecanismos osmóticos. Los dinoflagelados se dividen sexual o asexualmente, y por medio de quistes. En la reproducción no sexuada el dinoflagelado se divide transversalmente y las dos mitades restauran su membrana y su teca en el caso de los acorazados. La reproducción sexuada, por medio de las dinosporas como gametos no ha sido confirmada. En circunstancias adversas forman quistes, que pueden ser temporales (ecdysales, película) o quistes verdaderos (permanentes,

hipnozigos o *hipnoquistes*). Estos últimos permanecen *sine die* en los fondos marinos, en espera de su reactivación por factores desencadenantes, para rebrotar en algún momento impredecible como *marea roja*.

La biomasa fitoplanctónica, constituida por los productores primarios fotosintéticos del océano, es productora de una compleja variedad de sustancias extracelulares, además de sus propios productos de catabolismo, que llegan a formar parte del complejo ambiente de nutrientes, quelantes, aceleradores o inhibidores del crecimiento y toxinas, que en conjunto favorecen el crecimiento de unas especies y dificultan la proliferación de otras. Estas moléculas activas, son conocidas como «ectocrinas» o «exocrinas», en general con propiedades antimicrobianas y toxinas que se liberan a la rotura y muerte de su portador. De todas estas sustancias las más significativas desde el punto de vista médico, sanitario y económico son las toxinas, pues inciden negativamente sobre la biomasa marina de interés comercial y puede afectar en su salud al hombre y a comunidades más o menos amplias a través de la cadena alimentaria. Las toxinas de dinoflagelados se encuentran entre las no proteicas más poderosas, conocidas hasta el momento.

Las consecuencias de las «mareas rojas» son habitualmente catastróficas, como la mortalidad masiva de peces y otros organismos de hábitat marino. La liberación de moléculas tóxicas de dinoflagelados, puede producir un verdadero «desierto biológico». El contacto del hombre con «marea roja» toxigenica o la ingestión alimentaria de moluscos transvectores de estas toxinas son causas de afectación de la salud humana.

Los cuadros clínicos debidos a toxinas de dinoflagelados se agrupan en dos grandes síndromes: «las intoxicaciones por moluscos» en sus versiones «paralítica», «neurotóxica», «diarreica», «simil diarreica» y «amnesia», adquiridas por el consumo de moluscos filtradores como almejas, ostras y mejillones, ubicados en el seno de una «marea roja» y que han filtrado grandes dosis de toxinas al ingerir masivamente los dinoflagelados del plancton. Estos moluscos se conocen como transvectores primarios, por ser consumidos por el hombre. Un segundo grupo está representado por las mareas rojas causadas por un dinoflagelado desnudo, como es *Ptychodiscus brevis*, que puede ser transmitido por vía alimentaria a través de malucos, o tras su muerte masiva, ser inhaladas las toxinas por aerosoles del oleaje, o conjuntivitis y dermatitis de contacto al bañarse en esta

agua cargadas de toxinas; un tercer tipo de intoxicación alimentaria, producida por dinoflagelados epifitito, *Gambierdiscus toxicus*, que es la «ciguatera», una de las más apasionantes intoxicaciones, por su historia, sus repercusiones sociales y económicas, y su coste médico y preventivo. Otras intoxicaciones relacionadas, menos frecuentes, o más recientemente descritas, serán consideradas o reseñadas aquí. Un último grupo estaría representado por las Cianobacterias, o algas verde-azules, fotosintéticas, marinas, terrestres o dulceacuícolas. Varias especies de hábitat costero o de estuario son productoras de moléculas neurotóxicas o hepatotóxicas, que están tomando un creciente predicamento de nuevo riesgo, si bien más en las especies de aguas dulces estancadas, que en las más libres aguas costeras marinas. Las «mareas rojas» pueden ser ictitóxicas», que producen mortalidad masiva de peces, antropotóxicas, que afectan al hombre, o ictioantropotóxicas, que afectan ambos. Las mareas rojas no toxigénicas, pueden igualmente producir mortalidad masiva de peces, por causas mecánicas, como el bloqueo de las branquias para la captación de oxígeno, lo que conduce a la muerte por asfixia, o por la depleción del O₂ disuelto en el agua, consumido para la mineralización de la materia orgánica muerta del «*bloom algal*», lo que equivaldría a la muerte por anoxia.

CUADROS CLÍNICOS DE INTOXICACIÓN POR MOLUSCOS

Intoxicación paralítica por moluscos - Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) / Mitilotoxismo - Saxitoxismo

El enrojecimiento del mar, con mortalidad masiva de peces e intoxicación del humano, tiene antecedentes muy antiguos, que justificarían fenómenos de difícil explicación. Nos referimos a la primera plaga de Egipto, descrita en el Éxodo. Al Mar Rojo, que recibe ese nombre por adquirir ese color con motivo de mareas rojas. El Mar Bermejo de Cortés, en América, y las descripciones de Bralop en Alaska en 1799. En Europa, la historia se inicia en 1885-1886, con el brote de intoxicación de Wilhemshaven, en Alemania, ocasionado por el consumo de mejillones, y estudiado por el patólogo Virchow, y descrito con el nombre de «mitilotoxismo», de *Mytilus edulis*, el mejillón. Más tarde, con grandes intervalos de tiempo, se describe en Oslo (Noruegas) en 1902; en Calais (Francia) en 1907; en Bélgica en 1939;

en Inglaterra en 1968, y en Galicia (España) en 1976. Las toxinas de esta intoxicación es conocida actualmente como «saxitoxina», de la almeja *Saxidomus giganteus*, transvector característico en USA, donde se identificó la toxina y su estructura química.

Los transvectores más significativos epidemiológicamente son los bivalvos filtradores, que acumulan grandes dosis de toxinas al capturar como alimento las algas del bloom. Los mejillones alcanzan una toxicidad muy superior a la alcanzada por las ostras en las mismas aguas.

Las toxinas de PSP son reconocidas por diversos nombres de grupos químicos, como Gonyautoxinas GTXI – GTXIV, Neo-STX, Carbamoyl-PSP-TXs, Decarbamoyl-PSP-TXs, o la denominación de conjunto, PSP-toxinas. Todas ellas representan variaciones moleculares de la molécula de referencia, Saxitoxina. La Unidad Tóxica de STX es la MU (Mouse Unit), equivalente a la DL50, determinada por vía i.p. en el ratón de 20 gr de peso, que produce la muerte por parálisis en 15 minutos.

En los transvectores primarios, las toxinas producidas naturalmente por el dinoflagelado responsable son modificadas molecularmente, siendo la toxicidad la suma de las distintas toxicidades de cada molécula. Las PSP-toxinas pueden acumularse en el biota marino por bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena alimentaria.

Las PSP-Toxinas se presentan al menos en 20 formas moleculares relacionadas, siendo las más tóxicas las forma «carbamato – toxinas», como las «saxitoxina» y «goniautoxinas», seguidas en toxicidad por el grupo de las «decarbamoil – toxinas», y finalmente por las «N-sulfocarbamoil – toxinas».

Las PSP-Toxinas son neurotoxinas de acción rápida que inhiben la transmisión del impulso nervioso por bloqueo de los canales de sodio. Estas toxinas pueden conducir a parálisis respiratoria y muerte en pocos minutos o en pocas horas. Los dinoflagelados relacionados con el PSP pertenecen a los géneros *Alexandrium spp.* (ex *Gonyaulax* o ex *Protogonyaulax*), principalmente.

Aspectos médicos de la PSP

La clínica de la PSP es característica: Comienzo en 30 minutos después la ingesta de los bivalvos transvectores. Aparición de pares-

tesias circumorales, extensión a cara y extremidades. Trastornos respiratorios, parálisis progresiva y respiratoria, y muerte. El tratamiento es sintomático y de mantenimiento, desde el lavado gástrico precoz a la respiración asistida. Si se consigue supervivencia durante 24 el pronóstico es favorable.

Las especies más representativas de la PSP son el *Alexandrium catenella* en las costas de California, Pacífico USA y Alaska. *Alexandrium tamarensis* en el Atlántico USA y Europa. En el brote de origen gallego de 1976 se contabilizaron un total de 130 casos, que fueron diagnosticados, por exportación de mejillones gallegos, a Francia, Suiza, Alemania e Italia, y a España. En ésta, dos brotes más discretos tuvieron lugar en los años 1993 y 2000, y en otros se ha vedado la recolección de moluscos.

Este brote fue motivo para adoptar medidas comunitarias de control de toxicidad en los moluscos de consumo y normas de vigilancia del fitoplancton costero para detectar el potencial inicio de una marea roja.

La eliminación o depuración de las toxinas en los moluscos transvectores varía con las especies, siendo rápida en los mejillones, como *Mytilus edulis*, y lenta en las «veneras», como *Placopecten magellanicus*, de semanas en el primer caso y de meses o años en el segundo. Los mejillones eliminan solo el 50% de su toxicidad en unos 12 días pero retienen una toxicidad residual durante largo tiempo. Las normas reguladoras de control sanitario admiten concentraciones de 80 µg por 100 gr. de carne comestible del molusco. Las conservas de mejillones, especialmente en salsas alcalinas, disminuyen la toxicidad por el autoclavado y la alcalinidad, y la eliminación del agua de cocción, que elimina la toxina hidrosoluble, pero siempre queda toxicidad residual.

Intoxicación Neurológica por Moluscos - Neurologic Shellfish Poisoning (NSP)

Es la segunda forma descrita de intoxicación por moluscos. Producida por el dinoflagelado no tecado, conocido en su zona endémica como «Florida Red Tide organism», recientemente rebautizado como *Karenia brevis* (*ex Ptychodiscus brevis*; *ex Gymnodinium breve*), sus brotes son característicos en el Golfo de Méjico, costa Oeste de La Florida y el Caribe. A veces afecta a la costa Atlántica

de Florida hasta Carolina del Norte. Es una especie icthio y antropotóxica, que afecta a la Salud Pública y la economía playera de las costas afectadas por la muerte masiva de peces, por el riesgo de intoxicación tras el consumo de moluscos transvectores, y por la irritación cutáneo-mucosa (dermatitis, conjuntivitis) o trastornos respiratorio por inhalación de aerosoles producidos por el oleaje y los vientos, cargados de toxinas. Las toxinas de esta especie se conocen genéricamente como Brevetoxinas (PbTXs), que son neurotoxinas liposolubles liberadas al medio marino al destruirse masivamente la biomasa específica ocasionada por el «bloom». Las brevetoxinas A y B tienen una estructura de poliéter cíclico.

Aspectos médicos de la NSP

La sintomatología es superponible a la del PSP, en el caso de la ingestión de moluscos filtradores residentes en las aguas afectadas por la «marea roja», con parestesias orales centrifugas, quemazón de mucosas, sensaciones térmicas alteradas, náuseas, diarreas, dolor abdominal, incoordinación motora, calambres, parestias, midriasis y, excepcionalmente, parálisis respiratoria y muerte.

El baño en estas aguas cargadas de toxinas produce dermatitis e irritación de mucosas, especialmente conjuntivitis, y trastornos respiratorios por la inhalación de aerosoles provocados por el oleaje y los vientos de las aguas costeras. Los aerosoles provocan a distancia la mortalidad de peces de acuarios y de alguna forma la muerte de manatíes.

Intoxicación Diarreica por Moluscos - Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

Se trata de un síndrome gastrointestinal humano, ocasionado por la ingestión de bivalvos portadores de toxinas producidas por los dinoflagelados *Prorocentrum lima*, *P. concavum* y *P. hoffmannianum* y *Dinophysis acuta*, *D. fortii* y *D. acuminata*, productores de toxinas liposolubles de estructura poliéter cíclico cuya molécula básica es el ácido Okadaico, y sus variantes, en conjunto conocidas como «dinofisistoxinas» DTXs 1 – 5 y otros derivados como los dioles o los sulfatos, hidrosolubles. Los transvectores son moluscos bivalvos,

especialmente el mejillón. Las pectenoxinas y yessotoxinas están también relacionadas con los cuadros diarreicos. El ácido okadaico se aisló inicialmente de la esponja *Halichondria okadaei*. Es un inhibidor muy potente de las proteínas fosfatasa 1 y 2^a y un efecto importante de promotor tumoral.

El cuadro clínico se inicia entre 30 minutos a 5 a 6 horas después de la ingestión de los moluscos, con vómitos, diarreas y dolor abdominal. La recuperación se produce en dos días. Más recientemente se atribuye a las dinofisistoxinas un efecto promotor cancerígeno. La incidencia de brotes de intoxicación diarreica por moluscos por su distribución geográfica ha sido descrita en Japón, Norteamérica y Europa. En nuestro continente ha afectado en los últimos años a Noruega, Irlanda, España y Portugal. El brote español se inicia por el consumo de mejillones de origen gallego, con una DL50 oral para el ratón de 160 mg/kg en 24 horas, con diarrea constante. En Murcia, en 1981, la DSP afectó a 3.500 personas, con diarreas, dolores cólicos y vómitos. El periodo de comienzo del cuadro varió entre 5 y 12 horas.

Diarrhetic Shellfish Poisoning – Like (DSP-like) Azaspiracid – Shellfish Poisoning (AZP)

Es un cuadro similar al anterior, pero el estudio de la toxicología demuestra que la toxina es distinta. Inicialmente se describe por Sataka et al., (1998a) una denominada provisionalmente «Fracción K» y poco después los mismos autores (1998b) describen la nueva toxina que denominan Azaspiracid, con estructura básica poliéter cíclico, cuya toxigenesis es incierta. En la costa oeste de Irlanda, en 1995 se describió un brote de una intoxicación por consumo de mejillones, que cursa con un cuadro diarreico, grave en este caso, con náuseas, vómitos y dolor abdominal. El test ratón no fue el típico de la DSP, pues los ratones presentan una sintomatología neurológica grave que causa la muerte tan precozmente como en 20 minutos.

Intoxicación por *Pfiesteria piscicida*

Una de las últimas aportaciones a la toxicología marina por «mareas rojas» o «HABs» está representada por el extraño dinofla-

gelado *Pfiesteria piscicida*, relacionado entre 1991-1998 con mortalidad masiva de peces en la Escuela Veterinaria de Carolina del Norte, en la Costa Atlántica de USA. El ciclo biológico de *P. piscicida* es muy complejo, de al menos 24 estadios evolutivos. Se alimenta desde bacterias a vertebrados, según la disponibilidad de alimentos presentes y el estadio del ciclo. Puede aumentar su volumen somático más de 125 veces en unos diez minutos en algunos momentos del ciclo. En su estado habitual, *P. piscicida* no es toxigénica y se nutre de algas y bacterias. El estado toxigénico se origina por la presencia de cardúmenes de peces, cuyas secreciones y heces inducen al dinoflagelado a su estado fagocitario bajo la forma ameboide de su ciclo. La proliferación masiva de *Pfiesteria piscicida* y de otras especies conocidas provisionalmente como *Pfiesteria* - like, parece condicionada por la abundancia de nitrógeno y fósforo, aportados por aguas residuales, abonos agrícolas, aguas industriales, granjas avícolas y porcinas próximas, que vierten en las costas y eutrofizan los estuarios, y propician la proliferación masiva de otras algas que servirán de alimento a *Pfiesteria*, que a su vez producirá su propio *bloom*, y atacan a los bancos de peces de los estuarios afectados. La toxina mata larvas de moluscos e impide cerrar las valvas a la «vieiras», facilitando su predación; impide la eclosión de huevos de peces y mata los peces adultos de la zona. Estas características representan una enorme pérdida de recursos económicos de origen marino valorados en muchos millones de dólares.

Cuando *Pfiesteria piscicida* es estimulada a adoptar su fase toxigenica, las toxinas liberadas al medio acuático provocan en los peces incoordinación natatoria y aletargamiento, afectan a la piel y les produce lesiones y llagas sangrantes. En dos ingeniosas afirmaciones se ha descrito este comportamiento: «*Pfiesteria piscicida* no sólo mata a los peces, se los come» y *Pfiesteria* en su estadio toxigenico es «un asesino muy eficaz». Los peces afectados por la toxina manifiestan una disminución significativa de la respuesta inmune, encontrándose en la necropsia infecciones y lesiones en riñones, cerebro, hígado y páncreas.

De otra parte, las personas expuestas a *Pfiesteria* en la naturaleza, experimentan síntomas de intoxicación. En buceadores, nadadores, pescadores, que contactan con aguas en las que prolifera *Pfiesteria*, muestran trastornos respiratorios, dolor de cabeza, cambios de humor, dolores articulares y musculares, desorientación y pérdida de

memoria. En los tres brotes de 1997, que obligaron a cerrar la Bahía de Chesapeake, en Maryland, los pescadores fueron los más afectados, relatando desorientación en aguas que conocían bien, trastornos del equilibrio y falta de concentración. La recuperación de la normalidad requirió meses, según la gravedad del cuadro agudo. En el hombre las toxinas parecen actuar por inhalación de aerosoles de las aguas contaminadas, o por contactos con ellas, vías ambas no habituales en la epidemiología de los dinoflagelados toxigénicos, con la excepción de *Karenia brevis* (ex *Ptychodiscus brevis*) en la «intoxicación neurotóxica por moluscos». Esta sintomatología puede establecerse en uno pocos minutos, con quemazón en los ojos, respiración entrecortada, incoordinación motora, fallo de las piernas, y náuseas. La pérdida de memoria puede llegar a sospechar un diagnóstico de Alzheimer, con recaídas aun después de alejarse de la fuente de la toxina. La desorientación de los pescadores se estimó que ponía en peligro la navegación en las aguas en las que habían faenado toda su vida.

En los estanques de la Escuela de Veterinaria, donde se identificó la relación *Pfiesteria* y mortalidad de peces, el aire acondicionado vehiculó la toxina a otras zonas, afectando al personal. Igualmente deja una predisposición a las infecciones respiratorias, incluso neumonías de repetición. Paradójicamente las toxinas no han sido identificadas aun, se les supone un carácter volátil, o una precaria estabilidad química en el medio, lo que dificulta su estudio. Algún autor reciente ha señalado que el receptor de la toxina de *Pfiesteria piscicida* a nivel de los neurotransmisores parece ser la NMDA o N-Methyl-D-Aspartato.

El riesgo de inhalación de la toxina es tan elevado que requiere normas de seguridad del Tipo III, más alto aun que el exigido para la manipulación del HIV. Trajes herméticos, con aportación de aire purificado del exterior. Para la manipulación de peces afectados o de aguas contaminadas, es preceptivo el uso de guantes de goma. *Pfiesteria piscicida* ha dado lugar a tantas publicaciones médicas o sanitarias, como de especialización psiquiátrica o psicológica.

Intoxicación Amnésica por Moluscos - Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

Se trata de una nueva intoxicación alimentaria de origen marino, en este caso producida por la diatomea *Bacillariophyceae*, *Pseu-*

donitzschia pungens, causante de «blooms algales» a favor de la contaminación costera. Además de la contaminación de alimentos de origen marino, estos organismos han sido involucrados en mortalidad de animales y del hombre. Los «blooms» de *Pseudonitzschia* tienen lugar habitualmente en régimen de poca luminosidad, cuando la temperatura del agua está bajando y en un amplio rango de salinidad. La molécula toxica recibe el nombre de ácido domoico, un aminoácido hidrosoluble, relacionado con el ácido kainico, antihelmintico aislado del alga roja *Digenea simplex*, y el ácido glutámico, cuya producción está relacionada con la disponibilidad ambiental de sílice, fósforo, nitrógeno y trazas de hierro. La función o funciones del ácido domoico en el alga productora no es bien conocida, aunque podría tener alguna relación con la captación de metales trazas en las aguas. Por otra parte, no todas las cepas de *Pseudonitzschia* son productoras de ácido domoico o no lo producen en la misma cantidad. El ácido domoico fue identificado en 1991, y se aisló inicialmente de la macroalga *Chondria armata*. El ácido domoico puede encontrarse no solo en los moluscos sino también en peces y crustáceos. La detoxificación es rápida en los mejillones, pero las «navajas» *Siliqua patula* del Pacífico norteamericano es capaz de acumular la toxina ambiental con especie selectividad.

La «intoxicación amnésica por moluscos» fue informada por primera vez en Noviembre de 1987 en Canadá, con 153 casos, y más tarde se convertiría en un problema en Washington y Oregón en USA donde blooms de *Pseudonitzschia sp.* han tenido lugar. Se acepta que el ácido domoico pasa la barrera hematoencefálica y produce un daño permanente que da lugar a amnesia próxima. Actualmente esta sustancia es objeto de investigación en todos los moluscos exportables en la CEE, mediante cromatografía HPLC, más por razones comerciales y a exigencias de Japón, que por antecedentes o casuísticas en las costas comunitarias.

El cuadro clínico se inicia con diarreas y signos neurológicos, que en algunos afectados pueden ser graves y permanentes y en ocasiones letales. Los síntomas agudos se inician en unas pocas horas y hasta 48 horas después del consumo de los moluscos transvectores.

El ácido domoico actúa como un potente excitador neurotransmisor, y al igual que sus análogos, los ácidos kaínico y glutámico, se fija en los mismos receptores del cerebro humano, y su toxicidad es potenciada por la presencia de estos dos análogos en los tejidos de los moluscos transvectores en los cultivos de neuronas.

El cuadro clínico está representado sintomáticamente por vómitos (76 %), retortijones de estómago (50 %), cefalalgia (43 %), pérdida de memoria próxima (25 %) y diarreas (4 %). En la fase aguda, cefaleas, hiporeflexia, hemiparesia, oftalmoplejía, confusión y desorientación y coma. A veces arritmia cardíaca y abundantes secreciones respiratorias. En casos de autopsia en fallecidos por esta causa, se detecta necrosis neuronal en hipocampo y amígdala. La recuperación de esta sintomatología es lenta, durando hasta cuatro y ocho meses, con recurrencias. Fisiopatológicamente, el ácido domoico parece actuar sobre las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal, y sus axones motores. El tratamiento es sintomático y de mantenimiento.

La patogenia que afecta a la memoria estaría relacionada por la afinidad del ácido domoico por los receptores del ácido glutámico en el SNC, especialmente en las neuronas del hipocampo en núcleos donde se procesa la memoria. Mantiene abiertos los canales actuando como una excitotoxina. Esta activación permite la entrada de Ca^{++} en las neuronas, produciendo daño en sus funciones. La destrucción de estas neuronas puede dejar daños irreversibles que incapacitan permanentemente a las personas afectadas.

El ácido domoico es termoestable y no se inactiva por los tratamientos térmicos culinarios, por lo que no debe confiarse en este proceder como garantía de inocuidad.

Este grave riesgo ha inducido a la práctica de análisis sistemáticos de los moluscos destinados a la alimentación humana o animal para detectar la eventual presencia de ácido domoico en sus tejidos y adoptar las medidas preventivas procedentes. Los métodos analíticos son los bioensayos en el ratón, o la detección instrumental del ácido domoico y de sus isómeros mediante HPLC, o Espectrometría de Masas

En California, en 1998 se encontró ácido domoico en las anchoas, que fueron responsables de la muerte de cientos de leones marinos. Hay fundamentos para atribuir ciertos comportamientos desordenados en las aves marinas al comer peces portadores de esta toxina. En 2002 hubo un brote tóxico en Washington que impuso una cuarentena al marisqueo recreativo en las costas afectadas. En España ha sido identificada la *Diatomea Pseudonitzschia australis* relacionada con algunos focos de toxicidad en las costas de Galicia y Andalucía, detectados desde 1995.

Heterosigma akashiwo

Este alga *Raphidophyceae* del NE del Pacífico de USA y Canadá, ha entrado en el concierto de los «blooms algales» y de la toxicología marina, desde 1960 hasta hoy, en que se sigue teniendo en consideración esta nueva plaga. Es la causa de mortalidad masiva de salmones criados en jaulas oceánicas, con pérdidas de millones de dólares como consecuencia. Se atribuye estos *blooms* a la cría intensiva en espacios reducidos, donde las secreciones y deyecciones de los peces crean un ambiente propicio a la proliferación selectiva de *Heterosigma akashiwo* y su comportamiento letal sobre los salmones. Un fago que afecta a *Heterosigma* está siendo estudiado para su uso en el control de este problema. No se ha descrito la afectación humana por esta causa, pero la pérdida económica y la inutilización de un alimento proteico de reconocido valor bromatológico y alimentario si afecta indirectamente a la población potencialmente consumidora del mismo.

Ciguatera

La «ciguatera» es una intoxicación alimentaría consecutiva al consumo de pescados habitualmente comestibles e inocuos en las distintas costas marítimas, y que en determinadas circunstancias, sin signos ni síntomas de enfermedad en el pez, se vuelven tóxicos e inadecuados para el consumo. Estos pescados se denominan ciguatos, enciguatados o ciguatóxicos, según la terminología vulgar y científica, respectivamente. La adquisición de la toxicidad no depende del pez sino de las condiciones ecológicas de la zona. Se trata de una entidad clínica de importancia por su gravedad, y de trascendencia sanitaria y económica por afectar imprevisiblemente a poblaciones amplias en las zonas endémicas, insulares o costeras, cuya fuente proteica es fundamentalmente la pesca. Su distribución geográfica corresponde fundamentalmente a las zonas tropicales y subtropicales de los distintos mares y océanos, con particular incidencia en las Islas del Caribe y del Pacífico, donde tienen una amplia tradición mítica, histórica y científica, y una gran repercusión en la salud pública y la economía pesquera. Clínicamente la «ciguatera» se reconoce hoy como una enfermedad caracterizada fundamentalmente por la presencia de síntomas gastrointestinales, neurológicos,

y a veces dermatológicos, producida por la ingestión de peces ciguatos o enciguatados.

La primera cita de esta enfermedad, no de su nombre actual, que aparece mucho más tardíamente, se debe a Pedro Martyr de Angleria (Arona, Italia 1459 – Granada, 1526) médico y humanista italiano al servicio de España, a la que llega traído por el Conde de Tendilla en 1487, entrando al servicio de los Reyes Católicos primero, y de Carlos V después. En *de Orbe Novo Decadas*, publicada en Alcalá en 1530, donde recoge toda la información de los descubridores del Nuevo Mundo, aunque él no estuvo en esas tierras. En el describe la ciguatera, en las costas insulares del Caribe, donde se reconoce como una intoxicación adquirida por consume de grandes peces predadores, como las barracudas o picudas (*Sphyaena sp.*), que a su vez se suponía que habían adquirido la toxicidad comiendo los frutos caídos al mar desde un arbusto costero conocido por los españoles como «manzanillo venenoso», por ser sus cualidades negativas conocidas por los autóctonos. La teoría alimentaria se inicia aquí. Persistirá por muchos años, y se describirá por Antonio de Ulloa (Sevilla, 1716 - San Fernando, Cádiz, 1795) en su relación del viaje realizado a América, publicado en Madrid en 1772. Y será comentada por Antonio Parra en su obra sobre los peces del mar cubano, publicada en La Habana en 1787, más tarde por Felipe Poey y Aloy (La Habana, 1799-1891), que habla de la pesca «ciguata» en Cuba, sus cuarentenas y prevenciones y revisa las diversas etiologías consideradas previamente, si bien considera al pescado ciguato como un perro rabioso, pues en esta época la rabia se consideraba como un envenenamiento del perro que transmitía al hombre por la mordedura.

Hoy sabemos que la «ciguatera» es una intoxicación por peces ciguatos. Esta condición se adquiere a través de la cadena alimentaria de los peces, iniciada en los herbívoros que se alimentan sobre algas superiores colonizadas masivamente en su superficie por un dinoflagelado epifítico marino, descubierto por Adachi y Fukuyu en 1978 en la Isla de Gambier, en la Polinesia francesa. Desde 1530 en que se habla de esta enfermedad en España hasta 1978 no se aclarará la etiología, lo que representa 450 años de observación e investigación.

La epidemiología hoy está clara. Ciertas circunstancias ambientales dan lugar a la proliferación masiva del dinoflagelado epifítico *Gambierdicus toxicus* sobre algas superiores. Esta proliferación no es detectada como «marea roja» y pasa desapercibida, hasta que la

pesca, hasta entonces inocua, se muestra tóxica dando lugar a los primeros casos de ciguatera en un área costera hasta ese momento exenta. El que los peces carnívoros de mayor tamaño sean los más peligrosos se justifica porque en la cadena alimentaria desde los herbívoros, hasta los predadores más terminales, las dosis acumuladas de toxina son más importantes.

Aspectos médicos de la ciguatera

La sintomatología clínica de la ciguatera en el hombre es muy variable. Los cuadros sindrómicos más característicos son el neurológico, el gastrointestinal, el cardiovascular y el dermatológico, que pueden compartir sintomatología en un mismo afectado. En el cuadro neurológico, las parestesias son el síntoma inicial en la mayoría de los casos, acompañadas de mialgias, disestesias, ataxia, prurito, vértigo, calambres musculares e hiperestesia superficial. Los síntomas neurológicos son los más persistentes y duran varios meses, hasta 20 años, según la observación popular en las áreas endémicas. El cuadro gastrointestinal incluye diarreas, vómitos, dolor abdominal, y sólo dura unos días. Los cuadros cardiovasculares son propios de los casos graves y se manifiestan por bradicardia e hipotensión. Los cuadros de predominio dermatológico constan de prurito y reacciones cutáneas, frecuentes en los casos de ciguatera en las islas del Océano Pacífico. No existe terapéutica específica, y casi todo lo que se puede hacer es un tratamiento sintomático y de mantenimiento. La inyección i.v de una solución de manitol es un recurso valioso recomendado.

Las toxinas de ciguatera o ciguatoxinas (CTXs) son liposolubles, impregnan musculatura y vísceras de los peces ciguatos. Se trata de una toxina poliéter cíclico. Además suelen encontrarse «unas toxinas acompañantes» la Maitotoxina (MTX), hidrosoluble, que suele encontrarse en el tracto digestivo de los «peces cirujano», la Scariotoxina (STX), encontrada en lo Scaridae o «peces loro», y el ácido Okadaico producido por el dinoflagelado *Prorocentrum spp.*, implicado en la intoxicación diarreica por moluscos. *Gambierdiscus toxicus* produce Gambiertoxina (GTX), precursor de la «ciguatoxina (CTX) y Maitotoxina (MTX), la toxina marina más potente. La proporción de cada una de estas toxinas justificaría la dominancia de una u otra sintomatología, en cada caso.

La Medicina Preventiva de la ciguatera es difícil, pues no se puede analizar pez a pez la captura pesquera de cada jornada. Para peces grandes, los más peligrosos a este respecto, pueden investigarse con algunos recursos inmunológicos comercializados. Lo más seguro es el muestreo de la pesca en laboratorios de referencia hasta que la zona deje de estar ciguata, y en tanto ocurre, establecer una vigilancia y cuarentena de la pesca. Los tratamientos culinarios no inactivan las toxinas implicadas en la ciguatera.

Cianobacterias

Las cianobacterias (Cyanobacteria) o algas verde-azuladas, son bacterias verdaderas, fotosintéticas, que forman parte de bacterioplancton marino donde se comportan también como fitoplancton y productoras autótrofas primarias de materia orgánica y de oxígeno. Pueden encontrarse distribuidas mundialmente en tres hábitats fundamentales: en las aguas dulces, en tierras y en el mar. Al igual que otro fitoplancton puede ser causas de explosiones o blooms que normalmente se manifiesta por el color verde de las aguas, especialmente en estanques, charcas y depósitos cerrados de agua. Las cianobacterias de hábitat marino o de estuario también pueden ser «causa de blooms», quizá menos manifiestamente, dada la mayor masa de agua y su movimiento constante. Actualmente hay una gran preocupación por la proliferación masiva de cianobacterias toxigénicas en aguas dulces relacionadas con el aprovisionamiento humano, directo o indirecto, y son numerosas las publicaciones a este respecto. En el medio marino y de estuario también puede ocurrir este fenómeno, incluso con afectación humana, especialmente por ingestión de moluscos filtradores de estas bacterias fotosintéticas con capacidad toxigénica También puede actuar sobre la piel humana por contacto durante baños u otra relación directa con las aguas. Este es el caso de la cianobacteria *Lyngbya majuscula*, que crece sobre rocas en mares tropicales y puede causar ampollas graves, si consigue penetrar entre la piel y el traje de buceo. Actualmente se consideran las especies marinas más representativas en los géneros *Lyngbya* y *Nodularia*. La especie *Lyngbya majuscula* es productora de varias toxinas, como la «debromoaplysiatoxina», la «aplisia toxina» y la *lyngbya A toxina*, que son causa de dermatitis y promotores tumorales. La especie *Nodularia spumigena* es la primera cianobac-

teria reconocida como causa de muerte de animales (Francis, 1878) La toxina, denominada «nodularina» es un pentapéptido cíclico hepatotóxico, que induce hemorragias masivas en el hígado de los mamíferos y causa lesiones hepáticas alterando su estructura. Produce «blooms» que afectan a peces y cangrejos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- ANDERSON, D. M.; WHITE, A. W. and BADEN, D. G. Edts.: *Toxic Dinoflagellates. Proceedings of the Third International Conference on Toxic Dinoflagellates*. St. Andrews, New Brunswick, Canada, June 8 – 12, 1985. Elsevier, New York, 1985.
- FAO.: *Marine Biotoxins*. FAO Food and Nutrition Paper 80. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Roma, 2004
- HALSTEAD, B. W.: *Phylum Protozoa*. (in *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. Vol. 1, pp. 157-240. US Govt. Printing Office, Washington D. C, 1965.
- SAR, E. A.; FERRARIO, M. E. y REGUERA, B. Edts.: *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, España, 2002.
- TAYLOR, D. L. and SELIGER, H. H. Edts.: *Dinoflagellate Blooms. Proceedings of the Second International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms*. Key Biscayne, Florida, October 3 – November 5, 1978. *Developmments in Marine Biology*. Volume 1. Elsevier/North – Holland, New York, 1978
- VILLALBA, A.; REGUERA, B.; ROMALDE, L. y BEIRAS, R. Edts.: *Molluscan Shellfish Safety. Proceedings of the Internacional Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Santiago de Compostela, Spain, June, 4-8, 2002. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia. Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO, 2003.

INTERVENCIONES

Prof. Rey Calero

Quiero felicitar, ante todo, a los dos ponentes de hoy porque realmente nos han hecho un bello recuerdo de Cádiz y recordar también con esta densa y profunda exposición que nos ha hecho el Prof. Mira de este problema, la marea roja, que a veces la sufrimos, que es extraordinariamente tóxica; en fin, ha sido un placer haberles escuchado a los dos. Uno recuerda aquello de Alberti: «dame, oh mar, la sutileza, la gracia de tu ritmo renovado». Realmente habéis puesto la sutileza, la gracia de este ritmo gaditano. Al Prof. Mira le

quiero decir que juntos aprendimos muchas cosas y que lo que se aprende de joven toda la vida dura.

Prof. Pérez Pérez

En primer lugar, mi felicitación al Prof. Mira por esta magnífica conferencia que me ha interesado mucho, precisamente en este momento histórico en que estamos muy preocupados por la calidad y seguridad alimentaria. Yo soy veterinario y me pilló este tema muy hondo en 1976 en la Dirección General de Sanidad; tuve la oportunidad de crear la Subdirección General de Veterinaria y Salud Pública y tuvimos un problema gravísimo con la mitilitoxina. No hay que olvidar que España es el país más exportador de bivalvos, junto con Italia y Bélgica, concretamente mejillones. Este problema es muy grave, aunque bien es cierto que no es mortal, determina unos síntomas enormemente alarmantes y la gente queda muy preocupada. Recuerdo que aquel problema surgió cerca de Navidades, se suspendió toda la exportación y tuvimos que hacer una cadena especial y hoy, con la experiencia que hemos adquirido de esta mitilitosina, se crearon las depuradoras de bivalvos, que consiste en que este material se consumen previamente empaquetados en unas redes que se tienen en las depuradoras, donde pasan varios días con agua dulce en virtud de la cual van eliminando la toxina y se liberan, pero antes, en cada uno de los ingresos se hace el macerado de un material, y sabemos de su toxicidad. Es tremendamente grave y es muy posible que los clínicos en algún caso puedan confundir alguno de estos síntomas, porque son muy duraderos, pudiendo ser una neuralgia, una parálisis, escozor bucal...

El problema es económico, sanitario y muy importante. Gracias a las depuradoras de moluscos, que hoy existen en todos los lugares donde se recolectan éstos, el problema prácticamente ha desaparecido. Hay un tema curioso, todos los peces que mueren intoxicados son consumidos por las aves y, sin embargo, es bien sabido que estas aves acuáticas que comen peces tienen unas glándulas en el origen de las fosas nasales que eliminan la sal, de tal forma que la sal, a la que las aves son enormemente sensibles como tóxico, lo eliminan, eliminando también esta toxina y así explicamos que estas gaviotas no se afectan de una manera tan directa e intensa como ocurre con los mamíferos por este fenómeno defensivo de las glán-

dulas de eliminación de sal y también de toxinas que poseen en la base de las fosas nasales. Una vez más le digo que es un tema precioso e interesantísimo, y creo que habría que tener más interés en el mismo porque es má frecuente de lo que parece, ya que hay muchos casos que hoy pasan desapercibidos.

Prof. Domínguez Carmona

Hemos tenido esta tarde dos sesiones extraordinarias y por ello felicito a los profesores Vilches y Mira, en la cual, aparte de la admiración que le tengo, hemos tenido unas vidas paralelas, nuestras oposiciones, médicos militares, Escuela Nacional de Sanidad, destinos en las Facultades de Medicina... Quiero señalar que he sido un discípulo y a través mío muchísimos, en relación con la aparición por primera vez en 1976 de la epidemia por mitilotoxina. Me comunican un proceso desconocido y extraño en el que habían comido mejillones y tenían el típico hormigueo en la boca, y yo; que había leído al Prof. Mira, señalé que era una mitilotoxina. Cogimos unos cuantos mejillones, hicimos un extracto con clorhídrico, lo inyectamos a unos ratones en el laboratorio y los ratones no presentaron ninguna sintomatología, y al inyectarles la décima me encontré a aquellos ratoncillos girando vertiginosamente sobre sí mismos y a los pocos minutos caían muertos. La toxicidad de la mitilotoxina era extraordinaria y esto es un fenómeno que tiene una trascendencia desde el punto de vista científico y político.

CONTESTACIÓN DEL PROF. MIRA GUTIÉRREZ

Agradezco las amables palabras de felicitación a nuestras intervenciones, la del Prof. Vilches Troya y la mía, de los entrañables Profesores y Académicos Rey Calero, Domínguez Carmona y Pérez Pérez, que al mismo tiempo han rememorado los inolvidables tiempos de la Sanidad Nacional, el primer brote de «marea roja toxigénica» reconocido en nuestras costas, y las repercusiones médicas, sanitarias y legislativas que desde entonces forman parte de la preocupación preventiva española y comunitaria en un contexto internacional. Agradecemos al Prof. Pérez Pérez sus comentarios sobre el estado actual de este problema desde la perspectiva de la prácti-

ca operativa cotidiana. Y a todos los asistentes y Sres. Académicos por su presencia y generosa atención. Y agradecemos al Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina su amable y cariñosa presentación, sus añoranzas gaditanas, su amable invitación a participar en tan solemne acto en tan prestigioso e histórico lugar y sus efusivas y gratificantes felicitaciones por nuestra intervención. Muchas gracias a todos.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

Nuestra felicitación, y la mía muy especialmente, al traernos los aires de Cádiz, Prof. Vilches y Prof. Mira. Vuestras aportaciones han sido fantásticas.

XIX SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 15 DE NOVIEMBRE DE 2005

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

FUSIÓN RENAL EN PERÍODO EMBRIONARIO
RENAL FUSION IN EMBRYONIC PERIOD

Por el Excmo. Sr. D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO

Académico Secretario y Académico de Número

MIS BODAS DE PLATA CON LA ACADEMIA.
UN PRETEXTO PARA RECORDAR A LOS VIEJOS
AMIGOS DESAPARECIDOS

MY 25TH ANNIVERSARY WITH THE ACADEMY.
AN EXCUSE TO REMEMBER SOME OLD FRIENDS
WHO HAVE DISAPEARED

Por el Ilmo. Sr. D. JULIO CRUZ HERMIDA

Académico Correspondiente

FUSIÓN RENAL EN PERÍODO EMBRIONARIO

RENAL FUSION IN EMBRYONIC PERIOD

Por el Excmo. Sr. D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO

Académico Secretario y Académico de Número

Resumen

En la presente comunicación presentamos ocho embriones humanos, comprendidos entre los 16 y 30 mm., portadores de fusión media renal –riñón en herradura-. Realizamos un estudio descriptivo basado en cincuenta embriones de estos estadios (Colección Jiménez Collado), a fin de establecer los diferentes estadios normodiferenciativos, así como el posible horario en el que se establece esta malformación, para finalmente sugerir posibles mecanismos-hipótesis que expliquen la presencia de la fusión media renal.

Abstract

In the present communication we present eight human embryos, understood between the 16 and 30 mm., carrier of renal half fusion –kidney in horseshoe-. We carry out a descriptive study based on fifty embryos of these stadiums (Collection Jiménez Collado), in order to establish the different normodifferentiative stadiums, as well as the possible schedule in which the malformation settles down, for finally to suggest possible mechanism-hypothesis that explain the presence of the renal half fusion.

Las malformaciones o atipias congénitas del aparato génito-urinario son muy frecuentes; se considera que uno de cada 500 exámenes ecográficos prenatales demuestran una alteración urológica.

La frecuencia de la fusión renal es baja, apenas el 0,25 % de la población, siendo más frecuente en el sexo masculino, 2:1; generalmente, la unión se establece por una banda de tejido denominado

itmo, que en el 85% de los casos es tejido nefrogénico funcionante, el resto lo forma un irregular tejido conectivo, pero siempre, tanto en uno como en otro caso, incluido en su totalidad en la cápsula renal.

A destacar que aproximadamente en el 20% de las fusiones renales se ha localizado en el itmo o banda de fusión tumores, siendo el de Wilms y el adenocarcinoma los más frecuentes. En edad adulta, las manifestaciones clínicas son escasas, asintomáticas y en la mayoría de los casos el diagnóstico es casual, aunque el reflujo vésico-uretral es lo más frecuente.

Sin embargo, la presencia de fusiones renales medias en periodo embrionario es muy limitada, habiéndose descrito al día de hoy sólo nueve embriones humanos portadores de esta malformación; por ello, consideramos de interés presentar en esta Sesión Científica ocho embriones humanos de nuestra colección, comprendidos entre los 16 y 30 mm., que presentan con clara nitidez fusión renal media.

En la presente comunicación se describen los embriones, así como las preparaciones histológicas que nos han evidenciado la malformación. Seguidamente estudiamos embriones que nos sirven para describir el mecanismo diferenciador renal, analizando con especial énfasis las etapas claves del proceso normogénico.

El tema central de la organogénesis en los vertebrados radica fundamentalmente en la interacción inductiva entre láminas u hojas celulares, en modo especial epitelio-mesenquima, por la que se condicionan «ambientes tisulares de transformación», Jiménez Collado, 1971, que dan lugar al órgano definitivo. El mecanismo inicial de los estadios precoces de la morfogénesis renal se puede resumir en el contacto entre yema uretérica procedente del conducto de Wolff y blastema metanefrítico, proceso de inducción que acontece en el embrión humano al inicio de la 5.^a semana.

La primera generación renal, primera de las tres fases sucesivas en el proceso normodiferenciador, es el pronefros, cuya manifestación morfológica es visible en embriones de 10 somitos, formación homóloga al tipo de riñón que sólo se encuentra en los vertebrados inferiores. Organo rudimentario considerado «no funcionante», se extiende del 5.^o al 6.^o segmento, por lo que sólo un reducido número de cordones epiteliales se condensan formando cordones de los que algunos adquieren luz, al principio aislada y discontinua. Su importancia, no obstante, se debe al hecho que estos cordones al princi-

pio aislados e independientes, se aproximan y unen a la vez que en luz tubular se hace continua creciendo en dirección craneo-dorso-caudal, dando origen al tubo o conducto pronefrítico o conducto de Wolff que alcanza la cloaca a finales de la 5.^a semana. La base molecular para la iniciación de este proceso formativo aún no es clara, pero los experimentos de bloqueo de genes han sugerido que los genes del homeo-dominio Lim-1 y Pax-2 son de gran valor y dependencia.

De esta forma, el conducto de Wolff no sólo se «transformará» secuencialmente en el conducto mesonefrítico, sino que actuará a modo de inductor para la determinación del mesonefros.

No obstante lo anterior, se ha venido en considerar, Yamada 1940, que el pronefros se forma por autodiferenciación, de tal modo que la hoja media representaría un gradiente de potencialidades morfogénicas decrecientes en dirección medio-lateral; la parte media originará la notocorda, la medio-lateral somitos y riñón y la más lateral sangre, gradiente que mantiene su potencialidad y significación prospectiva, ya que una posición lateral-sangre trasplantada junto a notocorda *aumenta* su potencialidad morfogénica y da lugar a somitos.

Aunque el cordón o área nefrogénica es el territorio a partir del que se originan las generaciones renales, no puede interpretarse en términos de biología del desarrollo, que otras áreas embrionarias no sean capaces o no tengan capacidad para transformarse en riñón en determinadas circunstancias. Experimentalmente conocemos como el ectoblasto de una gástrula es capaz de originar tubulillos renales si es trasplantado a la región nefrogénica de otro embrión, e igualmente tejido injertado en el blastocele de una blástula joven, es capaz de inducir tubos renales en el ectoblasto suprayacente. Todo ello indica la existencia de un «campo nefrogénico» en el sentido morfodiferenciativo de este vocablo.

Antes que desaparezcan los conductillos pronefríticos más caudales, comienza la formación del mesonefros, proceso que tiene lugar según una secuencia craneo-caudal. Por tanto, la posición craneal de la formación, ahora aparecida, cabalga sobre los últimos corpúsculos pronefríticos, pero sólo aquellos topográficamente situados a partir del 6-7 somito alcanzan su completa diferenciación, dando lugar a cordones celulares que se transforman en tubos tortuosos en los que su extremo lateral se abre en el conducto de Wolf, ahora ya conducto mesonefrítico, puesto que no es otra cosa que la

prolongación caudal del primitivo pronefrítico. Por su estructura es posible distinguir pronto en el tubo nesonefrítico una parte proximal, vecina a la posición invaginada por capilares procedentes de la aorta, otra de transición, una intermedia y finalmente otra de conexión que se abre en el conducto mesonefrítico.

Al contrario del pronefros, la diferenciación del mesonefros se debe a un proceso de inducción, mecanismo órgano-dependiente desde antiguo contrastado experimentalmente, Waddington 1988, Gruenwald 1943, Jiménez Collado 1975. No obstante, y aunque el conducto de Wolff es el inductor «normal» del mesonefros, la experimentación ha demostrado que en condiciones atípicas, esta acción puede ser sustituida por otros tejidos, Rauscher 1990, Haber 1993; así, tejido nervioso es capaz en determinadas condiciones de inducir mesonefros, acción o capacidad inductora que puede ser ejercida sin que sea necesario contacto íntimo entre indicador e inducido, ya que si entre el mesenquima del cordón nefrogénico y el tejido neural se interponen láminas porosas, en dependencia al tamaño de los orificios se diferencian túbulos mesonefríticos, no así cuando la interposición se hizo con una membrana de celofán o coquilar.

Hacia el final de la cuarta semana de gestación, los conductos mesonefríticos o de Wolf se conectan con la cloaca, existiendo ya luz continua a lo largo de cada uno de ellos. Existe una diferencia entre los controles de desarrollo entre los cuatro a seis pares más caudales de túbulos o glomérulos mesonefríticos y los restantes. Los experimentos de bloqueo del gen WT-1, supresor del tumor de Wilms, dan como resultado la ausencia de túbulos mesonefríticos caudales, en tanto que los craneales que se mantienen conectados al conducto de Wolff se desarrollan normalmente.

Aunque existen evidencias de función urinaria en la formación mesonefrítica de los mamíferos, la fisiología del mesonefros no se ha investigado en profundidad. La producción de un filtrado se inicia a partir del asa vascular glomerular que fluye hacia la porción tubular donde tiene lugar la reabsorción selectiva de los iones; el retorno de los materiales reabsorbidos a la sangre se ve facilitado por la presencia de un plexo denso de capilares alrededor de los túbulos mesonefríticos. La estructura del mesonefros del embrión humano es muy similar a la de los peces y anfibios acuáticos adultos y su función principal es filtrar y eliminar los desechos orgánicos.

El desarrollo de metanefros se inicia al comienzo de la quinta semana, cuando a partir de la porción más caudal del conducto de Wolff, aparece una evaginación, esbozo inicial de la yema ureteral que se orienta y crece hacia la posición posterior del mesodermo intermedio, cuyos elementos celulares se condensan alrededor del divertículo, evaginación o yema ureteral para formar con especificidad el blastema metanefrógeno. El crecimiento de la yema ureteral a partir del conducto de Wolff es una respuesta a la secución del factor neurotrópico derivado de la línea de células gliales, GDNF, por parte del mesenquima indiferenciado del blastema nefrogénico, señal inductora ligada al c-Ret, miembro de la superfamilia de receptores de la tirosina quinasa localizado en las membranas plasmáticas de las células epiteliales de la yema ureteral; a su vez, la formación del GDNF en el mesenquima metanefrítico está regulada por el WT-1.

La base molecular del desarrollo metanefrítico es el crecimiento y ramificación de la yema ureteral, mecanismo a su vez regulado por una serie de reacciones inductivas recíprocas entre los extremos de las ramificaciones de la yema ureteral y las células del blastema metanefrógeno que las envuelven. Sin la presencia de ramificaciones ureterales no se forman túbulos, futuros conductos colectores; a la inversa, el mesodermo metanefrógeno actúa sobre este sistema induciendo la presencia de las ramificaciones. En respuesta a la señal inductora del GDNF al mesenquima metanefrógeno, las células epiteliales de la yema ureteral producen factor de crecimiento de fibroblastos, FGF-2, proteína morfogénica ósea, BMP-7 y Wnt-11, que inducen al mesenquima para que inicie el proceso diferenciador precursor epitelial de los túbulos renales, que a su vez requiere, o mejor, está condicionado por una señal inductora secuencial librada por el Wnt-11, producida por el mismo mesenquima metanefrítico. Esta inducción moldea el mesenquima metanefrítico para que se establezca un dominio epitelial tubular en el que las células expresan Wnt-4 y Pax-2 y una región estromal en la que las células mesenquimatosas expresan un factor de transcripción Winged helix BF-2.

Cuando se forman los riñones metanefríticos están localizados en el fondo de la fosa pélvica; al final del periodo embrionario y al comienzo del fetal experimentan un importante desplazamiento para situarse en la región abdominal. Este desplazamiento resulta en parte de una emigración real y en parte de un marcado crecimiento

to de la región caudal del embrión, por lo que se condicionan dos componentes vectoriales: por una parte, el desplazamiento caudo-craneal desde el nivel de la cuarta vértebra lumbar hasta la primera lumbar o incluso hasta la décimo segunda torácica; por otro, un desplazamiento lateral con la consiguiente rotación de 90° , gracias a ella las pelvis terminan orientadas hacia la línea media. Debido al componente de emigración y desplazamiento fuera de la cavidad pélvica los riñones se deslizan sobre las grandes y voluminosas arterias umbilicales, arrastrando, llevándose consigo restos mesonefríticos que involucionan, aunque algunos se conservan ya que terminan incorporándose a las gónadas en desarrollo.

Estructurado en síntesis el proceso normodiferenciativo renal, quedan importantes interrogantes a responder, tales como: determinación celular y movimientos nefrogénicos, mecanismos de inducción metanefrítico con especial selectividad en el proceso de transmisión de la señal inductora desde el esbozo uretérico al mesenquima, así como el análisis último de la propagación o difusión de la señal inductora dentro del mesenquima, interrogantes estas dos últimas que brevemente analizamos.

Aunque la inducción metanefrítica puede ocurrir a través de una membrana o filtro, Grobstein 1953, Saren 1987, estudios recientes han mostrado como los procesos citotoplásmicos se extruyen a través del filtro por medio de tejidos inductores que establecen contacto con el mesenquima; los filtros con poros de pequeño tamaño impiden esta transferencia, no iniciando los mecanismos mediante los cuales se realiza el proceso inductor. Conjuntamente, anticuerpos antimoléculas de la membrana celular tipo gangliosido GD3, y antimoléculas de la matriz extracelular como la Laminin A, Sariola 1988, Sorokin 1990, bloquean la inducción metanefrítica, hechos éstos que en principio sugieren como el contacto celular es indispensable, por lo que es considerada la mediación de moléculas de adhesión celular y proteínas tipo gap junction y en modo especial conexina. Sanio, 1992.

De igual modo, se ha evidenciado como determinados factores solubles, Auner y Sweeney, 1990, son capaces de modelar la inducción metanefrítica; tanto el factor de crecimiento transformador beta, -TGF beta-, como el factor inhibidor citosina de la leucemia, Lif, actúan como inhibidores o bloqueantes del proceso inductivo, Bardo y Riss, 1991.

Una vez que la interacción inductora inicial se produce entre

esbozo uretérico y mesenquima metanefrítico, es necesaria la presencia de mecanismos para el proceso de propagación, habiéndose considerado bien un mecanismo asimilador homeogenético por el que las células inducidas van propagando el nivel o carácter inductor a las vecinas, o por el contrario, un modelo migratorio por el que las células inducidas emigran a las diferentes capas.

Parece ser que experimentalmente los resultados descartan el modelo homeogenético, puesto que el mesenquima inducido no posee capacidad para transmitir señal inductora a otro mesenquima a través de poros; en este sentido se ha evidenciado como en mezclas o pull de células distensibles por su cariotipo, todos los elementos celulares formadores de túbulos renales derivan del componente mesenquimal inicialmente inducido, Saxen y col., 1971.

Los criterios por los que se viene a aceptar el modelo de migración fundamentalmente se basan en experiencias de heteroinjertos entre dos especies experimentales con diferente volumen y contenido nucleolar, codorniz-pollo; en los cultivos en los que el esbozo uretérico de embriones de codorniz fue extirpado con una capa o contenido de mesenquima y puesto en contacto o recombinado con mesenquima procedente de embriones de pollo, se diferencian formaciones nefrogénicas típicas de codorniz incluso a distancia de la localización uretérica. Esta migración de las células inducidas condicionarían un nuevo ciclo inductor, por lo que la transmisión o difusión de la señal inductora estaría mediatizada por interacciones a distancia entre esbozo uretérico y mesenquima metanefrítico, proceso aceptado por tanto de migración celular.

Una de las más recientes interrogantes hoy analizadas, es el de la existencia y capacidad tanto de las células mesangiales como la presencia de un factor angiogénico, proceso este de gran interés por cuanto la capacidad angiogénica podría ser la propia del mesenquima en fase inicial de su determinación. Experimentalmente explantes de mesenquima metanefrítico de embriones de ratón en membrana corioalantoidea de codorniz, Sariola 1983, han demostrado como el endotelio vasculo-glomerular, ahora diferenciado, únicamente inducirá mesenquima en el ovillo que se forma en el extremo proximal de la nefrona, hecho este que parece sugerir como el epitelio en proceso de diferenciación segrega un factor angiogénico tipo proteína ligadora de heparina FGF, Risau y Eklom 1986, o tipo resina que se expresa en las arteriolas eferentes en proceso diferenciador, Gómez 1991. Como los productos de degradación de la co-

lágena y fibronectina desarrollan capacidad angiogénica, los cambios en la matriz extracelular postinducción, pueden ejercer estímulo angiogénico para la invasión de los glomérulos, mecanismo por el que el tejido metafrogénico en fase de diferenciación, proporcionará una guía a los capilares en su proceso direccional evitando áreas de túbulos ya desarrollados que expresan laminina en su membrana basal, proceso que es a su vez dependiente de la capacidad de la fibronectina en la mediación y regulación migratoria en las etapas iniciales del desarrollo.

Clásicamente se ha venido en admitir numerosas teorías etiopatogénicas de la fusión renal media –riñón en herradura–, hipótesis que no han podido ser confirmadas experimentalmente, aunque dentro del síndrome malformativo caudal estas atipias están presentes.

Borden 1932, consideró podrían ser agrupadas en dependencia directa a su mecanismo lesional en: a) desviaciones específicas en los primordios renales y b) por mediación de factores externos. La primera de estas, fue de más antiguo la más aceptada, Lazuta, 1928, por cuanto interpreta que los uréteres pueden crecer hacia un único blastema metanefrítico, criterio éste que no puede ser hoy aceptado con rigor científico, ya que para que esto fuera posible sería imprescindible que ambas yemas uretéricas en su crecimiento se desplacen hasta la línea media juntas o en contacto previo a la confluencia con el blastema nefrogénico.

Considerado este desplazamiento como mecanismo inicial, gran número de autores aceptan que una vez establecido el contacto inicial, factores externos «mantienen y estabilizan» la fusión. Algunos de estos factores lo identifican con los movimientos de traslación y rotación del asa duodenal, desplazamiento y presión de la masa hepática, evolución del mesogastrio dorsal..., así como anomalías y variaciones del eje vertebral lumbo-sacro, anomalías vasculares, síndrome de regresión caudal, teratomas... De igual modo y también desde antiguo, Lewis y Papez, 1915, se consideró en base a las relaciones que normalmente establecen los esbozos renales con aorta y arterias umbilicales y la V invertida que configuran, que bien por aumento del calibre vascular o por desplazamiento de algunas formaciones vasculares, disminuya el ángulo de bifurcación que establecen, condicionando un obstáculo en el movimiento de ascenso, y por tanto, favoreciendo la fusión media.

Sin embargo, Cook y Stephens, 1977, consideran que la fusión renal ha de establecerse previa al desplazamiento y movimiento de

ascenso, embriones de 9 mm., ya que en todos los casos por ellos revisados, la maduración capsular renal se establece antes y en las fusiones ambas masas están completamente envueltas por esta estructura fibrilar continua y uniforme.

Friedlan y Wries, 1975, realizan una revisión y estudio descriptivo de doscientos diez embriones humanos comprendidos entre los 7,5 mm y 27 mm de la colección Carnegie, no encontrando riñón en herradura en estos estadios del desarrollo; a la vez analizan como el mecanismo, o mejor, proceso de ascenso renal, se realiza de modo similar a como lo hacen otras formaciones viscerales, puesto que las yemas ureterales y blastema metanefrogénico se localizan al inicio a nivel del segundo segmento sacro. Este proceso es coincidente en el tiempo con el crecimiento somático de la posición caudal del cuerpo embrionario, embriones de 9 mm, con predominio ventral, factor diferenciativo por el que la ensilladura lumbar que es típica y característica en estos estadios, sufre un proceso de aplanamiento o enderezamiento, Lendon, 1971, que «facilitaría arrastrando pasivamente» a las masas metanefríticas en dirección craneal. En base a este criterio, podría considerarse que al ser los polos superiores renales los que desde el inicio de este proceso diferenciativo se sitúan a mayor distancia entre sí, explicaría que los riñones en herradura tengan la mayor superficie de contacto y fusión a nivel del polo caudal y pelvis, hipótesis no obstante que para ser considerada habría de realizarse en embriones de 7 a 9 mm, ya que a partir de este estadio, la topogénesis renal está definitivamente establecida.

La observación clínica en recién nacidos cuyas madre ingirieron talidomida, Wiener 1973, de riñón en herradura o fusiones más o menos completa ha sido descrita siempre dentro del complejo malformativo y nunca como anomalía única y aislada, hecho éste que considera la necesaria existencia de un mecanismo mínimo de entecimiento en el desarrollo del extremo distal del cuerpo embrionario condicionante de focomielia, amielia y síndrome de regresión caudal.

Recientemente, Doménech Mateu 1988, considera que estos pueden ser los mecanismos condicionantes de fusión renal:

a) fusión de ambos blastemas metanefríticos debido a un desplazamiento convergente hacia la línea media de ambas yemas ureterales.

b) atípica relación entre esbozos metanefrítico y arterias umbilicales que al actuar a modo de pinza o V invertida desplazan a

ambas masas metanefríticas hacia la línea media, impidiendo o limitando la ulterior fase de ascenso.

c) aumento de los elementos parietales o simplemente de edemas que condicionen el desplazamiento hacia la línea media de las estructuras viscerales y consiguientemente de los blastemas metanefríticos.

Junto a estos tres probables mecanismos que pueden aislada o conjuntamente favorecer el desplazamiento medial de los esbozos renales, no descarta la posible incidencia de un cuarto factor, al que denomina «factor inicial», al considerar que los elementos celulares del área nefrogénica posterior al emigrar más tardíamente, darían origen a la presencia del itmo, que en estos casos se dispondría a modo de puente entre los esbozos procedentes del área nefrogénica anterior y los derivados de la posterior. Como este mecanismo se establece en tiempos diferentes al ser el proceso de invaginación del área anterior más precoz, es por lo que habitualmente se describe la práctica independencia de los polos superiores al contrario que la fusión de los polos caudales derivados del área posterior.

En síntesis, consideramos e interpretamos que varias pueden ser las hipótesis que explicarían la existencia de la fusión media renal:

a) teoría metanefrogénica por la que ambos blastemas metanefrogénicos se unen en estadios iniciales cuando aún se encuentran en el anillo pélvico, caudal a la horquilla arterial de las umbilicales;

b) teoría ureteral, por lo que al ser la yema ureteral el inductor del tejido metanefrítico, si ambas yemas tanto en su punto de origen a nivel de los conductos de Wolff como en la dirección de su crecimiento y orientación se aproximan, condicionan que los blastomas metanefríticos como sistema reactor, se fusionan;

c) teoría compresiva o de factores externos, en dependencia a la presencia de edemas, anomalías viscerales o malrotaciones que impiden o limitan el normal proceso de emigración;

d) síndrome malformativo de la extremidad caudal del cuerpo embrionario en dependencia al déficit somático;

e) teoría vásculo-dependiente por la que limita el mecanismo de desplazamiento del blastema metanefrítico por la persistencia de formaciones vasculares segmentarias –arterias mesonefríticas–, procedentes de la aorta;

f) teoría o factor inicial, por el que en las fases primeras de la citodiferenciación del material nefro-dependiente, al establecerse ritmos y tiempos diferentes en el proceso de invaginación a través

de la línea primitiva, el área posterior de la que depende el material que ha de diferenciarse a polo caudal renal, sufre un enlentecimiento y por consiguiente, alteración o modificación direccional condicionando posibilidad de fusión.

INTERVENCIONES

Prof. Carreras Delgado

Quiero felicitar al Prof. Jiménez Collado por esta magnífica conferencia y también por estas magníficas imágenes de anatomía embriológica y anatomía seccional, que son francamente ilustrativas. Quiero preguntarle un aspecto muy concreto; el riñón en herradura cada vez se diagnostica más, muchas veces no provoca patología y se diagnostica sobre todo por las nuevas técnicas de imagen que se usan profusamente, sobre todo ecografía y TAC. Estamos acostumbrados a ver en las imágenes una posición especial de los riñones, cuando diagnosticamos el riñón en herradura, porque no siempre se ve el istmo, que a veces es afuncional, con las técnicas de imagen funcional no se ve. Diagnosticamos la fusión por la posición especial de los riñones, que normalmente están más próximos en su polo superior que en el polo inferior; en el caso de la fusión se produce lo contrario y la fusión se produce hacia delante.

Mi pregunta es: ¿a qué se debe embriológicamente esta posición especial que nos permite hacer el diagnóstico?

Prof. Segovia de Arana

No voy a hablar de embriología porque apenas sé del tema, pero sí de la espléndida exposición que nos ha hecho nuestro compañero porque, usando los métodos nuevos de exposición, realmente es deslumbrante la claridad didáctica de todo este problema tan intrincado. Yo le felicito porque ha manejado fantásticamente bien la presentación. Mi comentario es hasta qué punto uno queda realmente absorto cuando va escarbando en esas leyes biológicas y va viendo hasta qué punto existe una cierta semejanza, una cierta similitud porque, oyendo esa disposición del desarrollo embrionario de los riñones, me estaba acordando de la famosa ley biogenética funda-

mental de Heikel, la ontogenia repite la filogenia, es decir, aquello que se va viendo a lo largo de la evolución de los seres vivos. Pero yo pienso que después de oír esta conferencia uno podría atreverse a modificar esa ley biogenética fundamental diciendo que la ontogenia repite la citogenia, es decir, hasta qué punto el desarrollo de la célula va teniendo sus pasos, va teniendo esos esquemas, esas leyes que apenas ahora estamos empezando a conocer.

Pero desde que uno conoce que en el núcleo de todas las células están todos los genes que son capaces de hacer proteínas y que después pasan al citoplasma y van haciendo las proteínas adecuadas para aquella diferenciación celular, es algo que a mí me recuerda estos mecanismos de diferenciación que nuestro compañero nos ha mostrado ahora. Creo que podríamos atrevernos a decir que hoy día, gracias a ese mundo de la medicina deslumbrante, que es el de la medicina genómica, estamos con capacidad para poder pensar efectivamente que la citogenia en todo su intrincado mecanismo de diferenciación es lo que va a dar lugar también a esa diferenciación que tan bellamente hemos visto expuesto por el Prof. Jiménez Collado. Le felicito de todo corazón porque realmente no sólo es un disfrute científico, sino un disfrutar estético y a uno le hace pensar que efectivamente estamos ante un mecanismo común maravilloso que realmente a todos nos deslumbra y nos atrae.

Prof. Perezagua Clamagirand

Debemos felicitar indudablemente otra vez a nuestro querido amigo, Prof. Jiménez Collado, por las magníficas muestras gráficas y sobre todo por el contenido. Nosotros los clínicos solemos encontrar el riñón en herradura de una manera casual, la mayoría de las veces sin ningún tipo de sintomatología ni ningún otro tipo de alteración de la función renal. La mayoría de estos riñones en herradura tenían asociados otro tipo de alteraciones embriológicas. Nos ha mencionado algo que se conoce que es como la talidomida, aparte de producir focomielias, tiene capacidad para condicionar alteraciones de este tipo. También nos ha dicho que no sabe exactamente de las seis teorías del mecanismo de producción, cual pudiera ser la más habitual; en estos casos que no hay alteraciones de otra índole en otros órganos ni de sistemas, ¿cuál podría ser su mecanismo causal?

**MIS BODAS DE PLATA CON LA ACADEMIA.
UN PRETEXTO PARA RECORDAR A LOS VIEJOS
AMIGOS DESAPARECIDOS**

***MY 25TH ANNIVERSARY WITH THE ACADEMY.
AN EXCUSE TO REMEMBER SOME OLD FRIENDS
WHO HAVE DISAPEARED***

Por el Ilmo. Sr. D. JULIO CRUZ HERMIDA

Académico Correspondiente

Resumen

Con motivo de cumplir el autor sus Bodas de Plata con la R.A.N.M., recuerda a los Académicos Numerarios y Correspondientes, que encontró en ella en el año de su ingreso (noviembre 1980), en plenitud de vida y trabajo, y con los que se relacionó estrechamente en los subsiguientes años, deparando esta relación pinceladas anecdóticas y humanas, a través de breves semblanzas personales.

Previo al recuerdo de los Académicos ya desaparecidos, figura otra relación de aquellos ejercientes como tales en igual año y que, felizmente, siguen conservando en la actualidad el preciado don de la vida.

Este ejercicio de **memoria histórica**, en que el recuerdo hace justicia a tantos nombres que prestigiaron la Medicina española, no quiere ser –en palabras del Prof. Cruz y Hermida– un capítulo de la Historia de la Medicina, pero sí una emotiva página de la Historia de la Real Academia Nacional de Medicina.

Abstract

As the author reaches his 25th anniversary with R.A.N.M., he remembers the academics therein, whom he found in the year of his entry (November, 1980), in the midst of life and work, and with whom he closely spent the following years, yielding anecdotal and human brush strokes through our

brief personal encounters. Before remembering the academics now gone, we note another of those relationships, begun like the others in the some year and, happily, still maintaining today the precious gift of life.

This exercise in historical reporting in which the memory does justice to those names that lent their prestige to Spanish Medicine, is not meant –in the words of Profesor Cruz y Hermida– to be a chapter in the history of medicine, but rather a page in the history of the National Royal Academy of Medicine.

Finalizando el año 1980 surge, para mí, una singular efemérides: el 11 de noviembre de dicho año, la R.A.N.M. me honra con su elección de académico correspondiente adscrito a la Sección de Cirugía. Se han cumplido, pues, hace 4 días, 25 años de aquellas calendas y, desde la perspectiva de un cuarto de siglo ya consumido, el pensamiento de Gasparín nos recuerda que «entre el pasado que huye de nosotros y el futuro que desconocemos, está el Presente en el que residen nuestros deberes». Y, quizá, el principal deber en este día se centre en la emocionada evocación de los amigos que encontré en la Academia en ese año de 1980 y que, desgraciadamente, ya no ocupan estos sillones, aunque sí permanecen en nuestro recuerdo. Esto no será un capítulo de Historia de la Medicina, pero sí pretende ser una modesta y cálida página de la Historia de nuestra Academia.

Voy, pues, a tratar de evocar a los Académicos Numerarios y Correspondientes, con los que compartí trato y amistad. El inexorable paso del tiempo se fue encargando de llevarse a los que voy a citar, pero todavía quedan algunos «supervivientes», a los que hago testigos de cuanto voy a comentar. Son ellos: **Hipólito Durán, Manuel Armijo, García Conde, Alonso Fernández, Clavero Núñez, Sánchez Granjel, Castillo Ojugas, Pedro Sánchez García, Domínguez Carmona, Rafael Enríquez de Salamanca, Menarguez, Salces, Felipe de la Cruz, Antonio Sierra, Pedro Lorenzo, García Jalón, Silverio Palafox, Ángel Nogales y Carmen Maroto.**

En el rescate de recuerdos de las personas amigas desaparecidas, va a jugar un papel importante la pincelada anecdótica y humana propiciada por el contacto profesional y de amistad que me unió a ellos, a manera de pretenciosa memoria histórica.

En una primera relación de personajes, a los que, por diferentes circunstancias, no pude tratar a fondo, me limitaré a reseñarlos con el simple recordatorio de sus nombres en la distancia:

D. Cristino García Alfonso: Señorial aspecto de arquetipo longilíneo.

D. Rafael Vara López: Aparente temperamento adusto, aureolado por gran prestigio quirúrgico.

D. Román Casares López: Científico amable.

D. Dimas Fernández Galiano: Una institución querida por todos.

D. José Bravo Oliva: Un sanitario de alta cualificación.

D. Primitivo de la Quintana: Otro sanitario de altura.

D. José Pérez Llorca: Alto mando de la Sanidad de la Armada y de la Oftalmología española.

D. Manuel Gómez Durán: En su saber cohabitaba la Cirugía general y la Ginecología.

D. Obdulio Fernández Rodríguez: Atisbé en él a uno de los grandes «seniors» de la Academia.

D. Agustín Bullón: Eminente patólogo, que pudo con todo en la vida, menos con su linfoma.

D. Enrique Costa Novella: Químico de tronío, con su hobby papirofléxico de las «pajaritas» de papel.

D. Rosendo Poch Viñals: No le conocí bien, pero sí me legó el conocimiento profundo con su hijo Joaquín.

D. José Gómez Orbaneja: En igual línea con el anterior. Sólo le conocí «a flor de piel», pero recogí herencia de amistad en su hijo Emilio Gómez de la Concha.

D. Vicente Gilsanz García: La formación clínica de Jiménez Díaz traspasando fronteras de la Complutense.

D. Alberto Sols García: Decían que iba para Premio Nobel. Su tránsito por la Academia fue muy breve: tan sólo 69 días.

Abordemos una segunda y amplia relación de hombres que ya son nombres en la historia de la Medicina y de la Academia, a los que el trato y amistad desarrollado en los años siguientes a 1980 me descubrió un mayor conocimiento de su ciencia y su humanidad, a través de sucintas semblanzas personales, siguiendo un orden cronológico de antigüedad por su ingreso en la Academia:

D. Valentín Matilla Gómez (I. 1943): La perfecta simbiosis del hombre con la Real Academia. No se sabe si la Academia fue Matilla, o si Matilla fue la Academia.

Hizo honor al cargo de Secretario perpetuo –más bien a perpe-

tuidad—, siendo Académico desde la era próxima al «Paleolítico» (1943) y abandonándonos, con el timón en la mano, a un paso del siglo XXI, sin que en su figura se hubiera producido la natural y progresiva degradación física y psíquica de los años. Algo debió influir en este fenómeno de conservación la sangre licuada de San Pantaleón, a la que diariamente veneraba en el cercano Monasterio de la Encarnación.

Proféticamente le bautizaron con el nombre de Valentín, y cumplió con el santoral al convertirse en enamorado de su familia y de la Academia durante su muy larga vida.

D. Benigno Lorenzo Velázquez (I. 1945): Fue un «duro» catedrático en San Carlos, simultaneando el rigor en los exámenes con la buena enseñanza de la árida farmacología. Al finalizar nuestra Licenciatura, un compañero, el Dr. Carlos Daudén, gran dibujante, le hizo a él junto a D. Valentín Matilla, una irónica caricatura, expuesta entre los actos de finalización de la Carrera. Se trataba de un fémur y una tibia, en cuyos cóndilos florecían sendas corbatas de pajarita. Abajo, una escueta y definitiva leyenda: «Dos auténticos huesos».

Tuve con él una estrecha relación personal y, siendo los dos vecinos veraniegos en Pozuelo de Alarcón, tuvimos oportunidad de intercambiar conversaciones y afecto en nuestros respectivos chalets.

Presidió el Tribunal de mi Tesis Doctoral y también tuve el honor de que presidiera, en mayo de 1981, mi primera intervención oficial en la Academia, titulada: «Agresividad médica en el campo de la reproducción humana». Al finalizar la misma, apostillé mi conferencia con una pregunta: «¿Se puede conceptuar como agresión el empleo del forceps? Me interesa saberlo porque tengo entendido que mi propio parto acabó con forceps». Su curiosidad permitió que el auditorio presente nos enteráramos de que, posiblemente, gracias a un forceps de Tarnier, la Real Academia tenía un Presidente de la categoría del Prof. Lorenzo Velázquez.

D. Juan Bosch Marín (I. 1947): Fue el pediatra social más importante de su época, encauzando desde la Dirección General de Sanidad todo el apoyo estatal a la protección del menor. Su labor de difusión y consejos puede concretarse en su pequeño «Catecismo de Puericultura». Sin ser catedrático ni ostentar ningún cargo docente en la Universidad, su prestigio pediátrico le abrió las puer-

tas de la Academia, siendo un punto de referencia y respeto por el resto de Académicos.

D. Pedro Laín Entralgo (I. 1950): Mi recuerdo transformado en leyenda. Para los seguidores de la Historia de la Medicina, Laín ha sido nuestro guía. Para los que sentimos el Humanismo Médico, Laín ha sido nuestro referente. Para los que hemos osado en algunos momentos convertirnos en pensadores, Laín ha sido nuestro mentor. Ser médico sin la fijación de Laín, no es ser verdaderamente médico.

Aunque fui alumno suyo en San Carlos, en su fase de madura juventud esplendorosa, vuelvo a coincidir con él en su ya edad proveyta, para ser recibidor de consejos y amigo. Tuve el agrado de dedicarle algunos de mis libros, y el honor de que me dedicara algunos de los suyos. Como honor fue el asistir el parto a su hija Milagros, apoyando el primer llanto de su vida a su muy querida nieta.

En el magno homenaje que el Colegio de Médicos de Madrid le rindió al concederle el nombramiento especial de Colegiado de Honor, al cumplir los 90 años, tuve el privilegio de pronunciar el Discurso de recepción con profunda envoltura emotiva. Al finalizarlo, D. Pedro, visiblemente emocionado, intentó levantarse de la silla de ruedas e iniciar un acercamiento hacia mí. Intuí que quería darme las gracias por mis laudatorias palabras, pero las suyas quedaron silentes en sus labios, dificultadas por la emotividad del momento. Siempre había creído que el maestro era un hombre correcto, pero frío. Desde entonces, me percaté que interiorizaba sus emociones, aunque las daba suelta en algunos momentos. Yo fui aquel día afortunado beneficiario de una de ellas.

D. José Botella Llusíá (I. 1950): Fue el gran maestro de la Ginecología española y muchos de nosotros le debemos a él nuestra vocación, por ser el inductor de la misma a través de su magisterio. Sus libros y artículos científicos permanecen vigentes, pues muchos de ellos fueron como los de Marañón, anticipativos a su época y permanentes en el futuro. Fue un gran Presidente de nuestra Academia.

Meses después de su muerte, la Real Academia de Bellas Artes y Ciencias históricas de Toledo, de la que era Académico de Honor, me honró invitándome a participar en la solemne sesión necrológica como discípulo del maestro, en presencia de las altas autorida-

des de la ciudad, su esposa e hijos. Allí expresé con emoción parte de la biografía científica y humana que adornaba al Prof. Botella. Publicado está el texto para quien se interese por su lectura.

En el año 50, siendo yo estudiante del último curso de la Licenciatura en Medicina, acudí con otros compañeros para escuchar el Discurso de Ingreso en esta misma Tribuna, sobre «La nutrición embrionaria». Le contestó el también Académico D. Francisco Luque Beltrán.

Allí, desde las «alturas» de este histórico salón, sentí la vocación académica, impactado por la solemnidad del acto, como un nuevo San Pablo en su personal camino de Damasco. Estaba escuchando a quien me sedujo para iniciarme en el camino de la Obstetricia y la Ginecología, y también a quien, con el tiempo, sucedería en el puesto de Jefe de Servicio del Hospital Central de la Cruz Roja. Mis deseos se vieron cumplidos y hoy, 55 años después, conmemoro mis bodas de plata con la Institución, distrayendo con mis palabras la atención de ustedes.

D. Ciriaco Laguna Serrano (I. 1950): Un pediatra de primerísima categoría y ejemplar maestro. Fue juez del Tribunal de mi oposición a maternólogos del Estado y, al finalizar la misma, su felicitación fue un refrendo de la amistad con que me distinguió en el futuro, acudiendo gentilmente a participar y prestigiar los Cursos para posgraduados que organizaba en mi Servicio Universitario de la Cruz Roja.

Nunca me falló, salvo la última vez. Me había dado cita en su casa para entregarle mi último libro y no me recibió. La muerte se anticipó a nuestro mutuo deseo.

D. Juan José López Ibor (I. 1951): Un gran maestro de la Psiquiatría y la Psicología y uno de los paladines de la Medicina Psicósomática. Nació en Valencia, en donde la luz y el mar mediterráneo parecen activar y potenciar las mentes propias para luego estudiar y tratar las de los demás. La tierra levantina no sólo es fértil en arrozces y naranjas, también lo ha sido y es en psiquiatras de alto rango.

López Ibor fue un intelectual renovador, y un hombre culto de saber holístico en la ciencia psiquiátrica (Reléase su libro sobre *La angustia vital*) y en el Pensamiento social. Una muestra del mismo, su ensayo de 1951 *El español y su complejo de inferioridad*.

La brillante impronta de la personalidad del Prof. López Ibor se aprecia en algunos de sus más relevantes discípulos: Alonso Fernández, Carbonell, Castilla Pino y su propio hijo Juan José. Otro aventajado discípulo, el Dr. Fernando Claramunt, en su primera visión y contacto con el maestro en 1952, lo define, entre la sorpresa y la admiración, como «rodeado de un halo invisible de intelectual carismático».

El Dr. López Ibor trató y curó a algunas de mis pacientes, en el plano profesional. En el afectivo y amical, tuve la fortuna de compartir con él agradables sobremesas, en las que el más exquisito postre era su culta y sugerente palabra.

Infortunadamente, una inteligencia lúcida y brillante fue pasto destructivo y progresivo del Alzheimer que, en certeras palabras del escritor Faustino F. Álvarez, «le hizo pasear sus últimos años por su misterioso bosque interior del silencio».

D. Alfonso de la Fuente Chaos (I. 1961): Una inteligencia fuera de lo común. Fue, para mí, más que un gran cirujano –que lo era–, un culto filósofo y pensador, que impregnaba de hondura y brillantez todos sus escritos y parlamentos. Aprovechó su fuerza política para mejorar la cirugía social de la época, siendo uno de los eficaces bastiones de la primigenia Seguridad Social.

Tuve el honor de ser alumno suyo el primer año que desempeñó la Cátedra de Patología Quirúrgica en el viejo San Carlos, y todos los estudiantes pudimos apreciar en él la categoría que atesoraba aquel joven profesor universitario.

Su facilidad y corrección de palabra era antológica. Un gran orador. No leía, hablaba, sin precisar de guiones y otros apoyos. Una prueba de ello fue su Discurso de Ingreso en esta Academia en mayo de 1961 sobre «La técnica quirúrgica en el siglo xx. Cuando la Ciencia se hace técnica». Las invitaciones anunciaban el acto solemne con la «lectura» del Discurso. Subió al atril, sin ningún papel, y durante una hora expuso brillantemente el tema. Fui testigo de ello y el suceso sigue permaneciendo vivo en mi memoria admirativa.

Me brindó su amistad y colaboración en varios de los actos científicos que organicé, y he gozado de igual amistad con algunos de sus más directos discípulos y colaboradores, todos ellos dotados con parejo prestigio de su maestro; todo un derecho de herencia.

El 3 de noviembre de 1988 se apagaba la tenue pavesa de vida que lo sostenía, apagándose con ella una de las mentes más lúcidas que habitaron esta Corporación.

El Alzheimer se cobraba con él y con López Ibor una doble presa. Esta vez, la muerte venció a la inteligencia.

D. Gonzalo Piédrola Gil (I. 1963): Hombre pequeño de estatura y alto en categoría científica y humana. Catedrático y General del Cuerpo de Sanidad Militar, vivía en calle con nombre también de igual grado: General Ampudia, próxima a mi consulta, y alguna vez que le visité en su casa, me expresó su felicidad de cicerone al enseñarme, desde los altos ventanales de su vivienda, una hermosa vista de la zona norte de Madrid. Un nombre histórico en la Sanidad española que tuvo la fortuna de perpetuarse en su hijo Gonzalo y su nuera Carmen Maroto Vela, para que los Piédrola fueran brillantes continuadores suyos en la Universidad española y en esta Academia de Medicina.

D. Félix Sanz Sánchez (I. 1965): Tras mi ingreso, fue cálido anfitrión mío con afabilidad y apoyo moral. Suegro del Dr. Martínez Cabruja, Patólogo Jefe del Hospital de la Cruz Roja, usó de esta circunstancia para impulsar un mayor acercamiento hacia mí. Los nueve años que le traté –ya que falleció en junio del 89– consolidaron una especial amistad. Pero no me dejó solo, y su sillón fue ocupado por otro gran amigo, Félix Pérez y Pérez, que es, hoy día, la continuación de su afecto.

D. Luis Felipe Pallardo Peinado (I. 1965): Conviví con él en diferentes e importantes secuencias de la vida. Fui alumno suyo del último curso de Licenciatura, comprobando sus grandes condiciones docentes, y sus vastos conocimientos de la Patología Médica. Luego, el maestro fue mi gran amigo, del que seguí aprendiendo. Más tarde le invité a mis Cursos de Posgraduado y allí nos habló de su gran pasión, la Diabetes; esta vez dirigida a las gestantes. En más de una ocasión, pública o privada, declaraba con entusiasmo que «la Diabetes mellitus y el Real Madrid eran dos de las cosas más importantes a ser tenidas en cuenta». Con el tiempo fuimos compañeros del claustro de Profesores de la Unidad Docente Universitaria de la Cruz Roja, y acabé, con orgullo, transformándome en el «ginecólogo de cabecera» de su esposa y sus hijas, ayudándole en la consecución de un título excepcional: el de feliz abuelo.

Murió de un cáncer renal, aparentemente en la ignorancia de conocer su mal, aunque para mí, un clínico de su talla no podría

ignorarle, pero sí encubrirlo para evitar sufrimiento al entorno familiar y de amigos.

Una triste y curiosa coincidencia: en el examen final y oral de la asignatura, año 1951, y con el Programa abierto sobre su mesa del Aula 2 de San Carlos, su dedo índice resbaló sobre los temas, para fijarse en uno del que me exigió rápida respuesta: «Diagnóstico diferencial de las tumoraciones renales»...

Murió tras penosa agonía. Su cuerpo fue expuesto en el Instituto de Diabetología de la Cruz Roja, y cientos de alumnos y pacientes diabéticos lo velaron con unción y respeto. Fue uno de los grandes clínicos de la Medicina española, cuyo recuerdo sigue acompañándome con dolor y respeto.

D. Enrique García Ortiz (I. 1965): Profesor adjunto de la Cátedra de Patología General del Prof. Bermejillo y especializado en cardiología clínica, el gusanillo de la Cirugía lo empujó a esta modalidad y, una vez formado en el extranjero, volvió a Madrid para erigirse, en la época inicial de la cirugía cardíaca, en uno de los pioneros de la misma junto a Rábago y Castro Fariñas. Fue Jefe de Servicio de esta disciplina en el Hospital Central de la Cruz Roja, simultaneando su labor con la Dirección del mismo.

Un dandi perfecto de atractiva y cuidada facha, que no perdía nunca la elegancia, ni siquiera cuando se colocaba los ropajes de bata y mascarilla en el quirófano. Se codeó con las grandes figuras mundiales de su especialidad y trajo a Madrid a participar en uno de sus Cursos al mismísimo Christian Barnard, con el que compartimos mesa y mantel algunos de los amigos de Enrique en su lujoso piso del Paseo de la Castellana. Al día siguiente se lo llevó a ver Toledo y El Prado, y por la noche tocaron palmas en el Corral de la Morería. Un gran cirujano y un gran anfitrión.

En los últimos años de su vida, agredido por un grave episodio vásculo-cerebral que le dejó con tristes secuelas neurológicas, acompañaba a su esposa a mi consulta en sus revisiones periódicas, apoyado en un penoso bastón, sin perder la compostura de su figura. Estaba muy preocupado por ella, pues, al no tener hijos, Elisa era su único sostén humano. Y ese sostén desapareció un malhadado día por mor de un infarto. Sus años postreros fueron de soledad absoluta, según me confesó en conversaciones telefónicas.

No le vi morir, pero tengo la seguridad de que lo hizo con la mayor dignidad y elegancia que le acompañó en vida.

D. Juan Rof Carballo (I. 1969): Una gran inteligencia, una mente extraordinariamente lúcida y un lujo español de la Medicina Internacional. Fue un gran Internista, con amplios y ecuménicos conocimientos médicos que plasmó, en su día, en un completo Formulario de Medicina Interna. También fue Endocrinólogo, Psiquiatra y Psicólogo de altura, siendo uno de los paladines de la Medicina Psicosomática. Dotado de gran pluma, la Real Academia de la Lengua le llevó a su seno siguiendo la ruta de Marañón y haciendo tandem con Laín. Sus «Terceras» en *ABC* fueron antológicas. Su profundidad de pensamiento expositivo hacía, a veces, ininteligibles algunos de sus párrafos, al estilo Dorsiano del obscurecimiento. Un botón de muestra, la comunicación que presentó en esta Academia el 4-II-92 con el título: «Anhedonia y Alexitimia», difícilmente de seguir por los que albergamos mentes menos capacitadas.

En el año 1970 le invité a pronunciar una conferencia en el Curso sobre «Endocrinopatías Ginecológicas» que organicé en la Cruz Roja. Desarrolló el tema «Bases endocrinas de la sexualidad», y se cumplió el «tirón» que tenía entre la juventud universitaria, sobrepasándose el aforo del amplio salón de conferencias. Igual ocurrió con otra invitación sobre otro sugestivo tema: «La urdimbre afectiva maternofetal», que nos obligó a utilizar una sala más amplia, en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Su amistad me proporcionó ser depositario de algunas interesantes cartas manuscritas tuyas que guardo como auténticas reliquias. Pese a su enorme prestigio intelectual, huía de la altivez y la prepotencia. Un sabio modesto, del que sus amigos presumimos con su presencia y seguimos presumiendo en el recuerdo de su ausencia.

D. Luis Bru Vilaseca (I. 1971): Un científico de tronío y un físico de proyección internacional. Me acercó a él nuestro común amigo Rafael Cortés, y hubo un positivo grado de empatía entre ambos.

Hablamos y discutimos los tres en algunas reuniones en su casa de la Residencia de Profesores de Isaac Peral, en las que ellos respetaban mis conocimientos del campo de la Reproducción Humana, y yo los suyos de la Física Cuántica y el fenómeno del Big-Bang. Fue un amigo para disfrutar y un maestro para aprender.

D. Manuel Blanco Otero (I. 1973): Nos conocimos mucho antes de ingresar ambos en la Academia. Todo un caballero con modales

sumamente correctos. Llegó a Madrid desde su Galicia natal con una sólida formación pediátrica al abrigo de la Universidad Compostelana, y aquí, como Puericultor del Estado, se integró en la Dirección General de Sanidad con Bosch Marín, desarrollando una impagable labor en la Puericultura social española, donde gozaba de la mayor consideración profesional y el favor de una selecta clientela privada infantil. Mis propios hijos crecieron bajo su cuidado.

En él se confirmó la paradoja: un hombre rodeado por legiones de niños, no tuvo hijos propios a los que poder entregarse, pero sí lo hizo con los sobrinos, actuando más como padre que como tío. El aforismo de que «a quien Dios no le da hijos, el diablo le da sobrinos» no fue del todo cierto en Manolo Blanco Otero, porque Dios le premió con la gracia del hermoso ejercicio de una adoptiva paternidad. Yo fui testigo personal de esta noble situación familiar, que me hizo admirarle aún más como ser humano.

D. Luis Cifuentes Delatte (I. 1973): La afinidad uroginecológica de Especialidades potenció un acercamiento entre ambos, plasmado en una inter-relación de conferencias y reuniones en nuestros respectivos Servicios hospitalarios.

Fue un adelantado de la urocirugía endoscópica y un avezado especialista en la génesis y tratamiento de las litiasis renales. Dejó en la Academia una importante huella científica y otra huella no menos importante: la de la amistad.

D. José Borrachero del Campo (I. 1973): Profesor Adjunto de D. Manuel Bermejillo, derivó su dedicación al campo de las enfermedades reumáticas, hasta el punto de llegar a ser uno de los primeros Catedráticos de Reumatología, alternando su labor docente y de investigación en la Complutense con la coordinación de la lucha nacional antirreumática de la Cruz Roja.

Fue un asiduo concurrente a nuestra Academia, en la que presentó innumerables y brillantes conferencias y comunicaciones, reflejo de su propia experiencia e investigación, a la par que atendía solícito a los Académicos que le pedían tratamiento para mitigar las «itis» y las «osis» de sus gastados huesos, músculos y articulaciones.

Ayudé a su mujer en sus parturiciones y trances quirúrgicos y fui testigo del cuidado y cariño que la profesaba, mirándola con ternura en quirófanos y paritorios. Tuvimos una estrecha relación profesional y de amistad, y esa intimidad me hizo convertirme en

triste acompañante de las reiteradas y graves enfermedades y operaciones que padeció.

Fue un profesional brillante y fecundo en su labor, al que las sucesivas y dolorosas patologías que sufría minaron cruelmente su cuerpo hasta hacerle esclavo de una silla de ruedas. Su muerte, que le dio paz y descanso, robó a la Medicina española a una figura de rango internacional, cuya huella de prestigio en la Reumatología permanece indeleble.

D. Rafael Cortés Gallego (I. 1974): Un brillante Ingeniero Industrial con vocación docente y ejercicio de Cátedra, que sustituyó en 1974 a otro insigne ingeniero, D. José Paz Maroto, entregando a su muerte el testigo a otro no menos insigne Ingeniero y Físico, nuestro entrañable amigo Francisco González de Posada.

Ya que en el campo profesional no teníamos afinidades, éstas sí surgieron en otros ámbitos de la vida cultural y social. Ambos compartíamos una singular devoción a la preciosa playa de Gandía, aunque no coincidimos allí en las vacaciones estivales, porque Rafael era alérgico a las multitudes que invadían el agua, la arena y los paseos de la playa los meses de julio y agosto, reservándose el lujo de habilitar fechas con más paz y menor densidad humana.

Presumía de tener el piso más alto en el edificio más alto de la playa. Desde el mismo abarcaba la amplia visión del Mare Nostrum y las costas de Cullera y Denia. Una vez me comentó con filosofía crítica: «Sabes, Julio, que desde lo alto de mi terraza he visto andando por el Paseo Marítimo al ministro X con su esposa, y lo he encontrado mucho más pequeño de lo que parecía...». Por el contrario, a sus amigos nos veía con superior estatura desde cualquier altura, al medirnos con la vara del afecto.

Una llamada telefónica el día de su fallecimiento, me sumió en la sorpresa y el dolor, ya que ignoraba la grave enfermedad que padecía y que él, con campechana extroversión, la ocultaba a sus amigos.

El 23 de abril de 1997, el sillón n.º 22 de esta Academia se quedó frío y silencioso. Su propietario lo había abandonado súbitamente, tras veintitrés años de asidua presencia en el mismo.

D. Jesús García Orcoyen (I. 1974): No fui alumno suyo en la carrera pero, como gran maestro de todos, me cupo el honor de ser seguidor de sus enseñanzas y gozar de una amistad ofrecida con

generosidad, no teniendo reparo en dirigirme la Tesis Doctoral, pese al enorme trabajo que sobre sus hombros pesaba, con la Cátedra, su Clínica y la Dirección General de Sanidad.

Hubo un momento en nuestras vidas que acortamos diferencias profesionales, pese a la sideral distancia de categoría a su favor que nos separaba. No existían entonces las revistas del corazón, pero, de haber existido, quizás los dos hubiéramos ocupado sus páginas. D. Jesús, asistiendo los partos de la hija del Jefe del Estado, el General Franco, y yo haciendo lo propio con la mujer del más grande de los futbolistas: Alfredo Di Stéfano. Convendría aclarar que D. Jesús García Orcoyen era el tocólogo de Carmencita Franco por su justo prestigio y categoría, mientras que yo, joven y desconocido tocólogo, de veintitantos años, lo era de Sara Di Stéfano, por la comodidad que suponía a ésta contar con un partero vecino; en la acera de enfrente de su casa.

El Prof. García Orcoyen, en 1968, formó parte del Tribunal que juzgó la provisión de la plaza de jefe de servicio del Hospital Central de la Cruz Roja. Su presencia en el mismo alentó mis esperanzas, ya que sabía las simpatías que don Jesús me profesaba.

Al finalizar la oposición me felicitó con estas palabras: «Le he apoyado porque pienso que será un buen sucesor de D. Francisco Luque. Espero que no me defraude». Sus palabras, nunca olvidadas, fueron permanente incentivo en mi trabajo hospitalario.

Como una faceta más de su sentido humanístico cabe recordar que, cuando entró en la Sociedad Española de Médicos Escritores y Artistas, me pidió que contestara a su Discurso de Ingreso sobre «La historia de la Fotografía». Pese a que yo era un analfabeto en la técnica fotográfica, acepté gustoso su petición, aunque le expresé mis serios temores de que, con la facilidad que se me velaban los carretes, también se me velaran mis palabras de respuesta a su discurso. Afortunadamente, mis negros augurios no se cumplieron y entre los dos, ese día recordamos a Niepce y Daguerre, en una sesión memorable en la que también recordamos a su maestro D. Sebastián Recasens, aficionado al arte fotográfico.

Fue un maestro de Ginecólogos, sin altivez ni prepotencia. Un hombre grande, pero sencillo.

D. Francisco Orts Llorca (I. 1975): Cuando llegué a la Academia, hacía cinco años que él había ingresado en la misma. Nunca le había tratado personalmente, pero pude constatar el respeto que

su prestigiosa figura suscitaba entre los Académicos. Respeto que asumí y que me acercó de «puntillas» a su persona, hasta que senté los «pies» cuando me abrió generosamente sus brazos.

Estando yo elaborando un trabajo sobre la percepción sensorial del feto intraútero, fui a recabarle a su casa, como gran embriólogo que era, mayor información al respecto. Se interesó por mi proyecto alentándome en el mismo. Me obsequió con un pequeño libro de su autoría, titulado *Cómo somos antes de nacer*, en el que desarrollaba un interesante estudio sobre la fase embrionaria y período fetal avanzado, que me fue de útil consulta.

La árida materia anatómica que dominaba la dulcificaba en algunos de sus escritos para hacerla más asequible al entendimiento del lector. Así ocurrió en el año 1990, cuando leyó el discurso inaugural del curso con un tema, aparentemente frívolo: «El dedo pulgar. ¡Qué maravilla!», pero que encerraba una estupenda lección sobre la anatomía funcional de ese dedo, que el humano ignora hasta que se le daña o lo pierde. Lo he releído hace poco y me ha vuelto a cautivar.

Paseando el verano pasado por el emporio urbanístico y turístico que es Benidorm, me encontré con la sorpresa de que un paseo próxima a la playa tenía el nombre de Avenida del Dr. Orts Llorca. Tras el agradable descubrimiento lo recorrí sosegadamente pensando en el maestro. La justicia de sus paisanos ha dedicado una calle a quien nació en este primitivo pueblo de pescadores. Don Francisco ha tenido la suerte de ser profeta en su tierra. Mi dedo pulgar, en esta ocasión, se mantuvo enhiesto en mi mano derecha, como signo jubiloso de victoria y justo reconocimiento de su paisanaje.

D. Antonio Gallego Fernández (I. 1975): Le conocí de estudiante, cuando él ya era Primer Adjunto en la Cátedra del Prof. Corral, y se perfilaba como el brillante cerebro gris de la misma. Sus clases tenían una profundidad conceptual que las hacía distintas a las restantes que escuchábamos. Perdí el contacto con él y lo recuperé en el 80 en la Academia. Aquí seguía siendo un hombre de notable rigor científico y crítico que lo demostraba en sus intervenciones de respuestas a los conferenciantes, en las que florecían algunos duros varapalos. En una de mis conferencias, en que abordaba aspectos de fisiología obstétrica, le veía en su sillón tomando algunas notas. *In mente* pensé en el varapalo que iba a recibir cuando terminaran mis palabras, pero mi sorpresa fue mayúscula al recibir su absolu-

to silencio. Cuando salíamos de la Academia le pregunté por su juicio a mi intervención y me contestó con voz grave, estas escuetas palabras: «Hombre, has dicho algunas cosas interesantes, pero no para tirar cohetes de entusiasmo. No he intervenido porque alargaría la sesión y me esperan a cenar unos amigos...». El desprecio endulzado por la cortesía.

Su Cátedra de la Complutense era un cedazo que cribaba los conocimientos de los estudiantes. La paja era el habitual suspenso, y el trigo lo premiaba con el aprobado o la nota. Formó con Tamarit un tándem de Cátedras de Fisiología muy rigurosas, que despertaban un halo de pavor en los estudiantes. Pero esa selección la notábamos positiva entre nuestros alumnos que habían superado la prueba, y comprendían mejor los conceptos fisiológicos que les explicábamos en los Cursos de Obstetricia y Ginecología de la Licenciatura.

D. Luis Calatrava Páramo (I. 1977): Sin habernos conocido previamente, durante los cuatro años que fuimos compañeros de Corporación, establecimos una amistad creciente. Era un hombre encantador y afectuoso. También teníamos afinidades humanísticas y pude recrearme escuchándole en esta Tribuna con su conferencia «Datos históricos sobre la enfermedad de los Habsburgo».

Resulta curiosa la buena amistad que he mantenido con los estomatólogos de la Academia. Primero con D. Pedro García Gras, de cuyas hijas fui ginecólogo. Luego con el querido y malogrado Juan Pedro Moreno. Hoy con mi entrañable Miguel Lucas Tomás, quien, entre sus rasgos de amistad, ha tenido la deferencia de colaborar en mi libro de las patologías de La Gioconda, opinando sobre un posible bruxismo condicionante de su misteriosa sonrisa.

Luis Calatrava fue coronel de Sanidad del Ejército del Aire y Catedrático en Madrid de Estomatología quirúrgica. Un inesperado proceso de grave patología le produjo la muerte en plena madurez profesional e intelectual, sumiéndonos a sus amigos en la dolorosa sorpresa de su desaparición.

D. Arturo Fernández-Cruz Liñán (I. 1977): Un intelecto brillante, acompañado del don de una simpatía contagiosa, con sello y grajejo sevillano. Fue Catedrático de Patología Médica en Santiago y Barcelona y de Patología General en Madrid. Presumiendo de haberse formado junto a dos grandes maestros: Marañón y Enríquez de Salamanca.

Don Gregorio lo «enmarañó» en las redes de la Endocrinología, de la que fue una autoridad. Su Discurso de Ingreso en la Academia versó sobre «El riñón como órgano endocrino». También fue un aventajado paladín de la Medicina Psicosomática, presidiendo la Sociedad Española de esta disciplina. Invitado a uno de mis cursos de la Cruz Roja, nos asombró a todos haciendo sencilla la dificultad expositiva de «la neuroquímica cerebral y los ritmos biológicos». Sabedor de mi ingreso en la Academia, llamó telefónicamente a mi casa para enviarme una cordialísima felicitación y exponerme deseos de colaboración y apoyo incondicional. Nunca olvidaré su generosa llamada, que no llegó a convertirse en realidad por su inesperada muerte ocho meses después. La Medicina española perdió una singular figura. Sus pacientes, el ángel protector de la salud, y yo, personalmente, un gran maestro y un buen amigo.

D. Jorge Tamarit Torres (I. 1979): Fue un Fisiólogo matemático, un Matemático fisiólogo; no en balde se doctoró en Medicina y Ciencias Exactas. Antes de obtener las Cátedras de Fisiología de las Facultades de Medicina de Granada y Madrid, apoyado por D. Fernando Enríquez de Salamanca, dirigió los Cursos del Doctorado sobre «Matemáticas para biólogos», y ahondó en la investigación sobre la insulina y la diabetes mellitus, así como en las leyes matemáticas aplicadas a las valoraciones biológicas.

Un mes después de ingresar yo en la Academia, él pronunció su Discurso de Ingreso en la misma sobre «Funcionamiento de los modelos de la regulación de la glucemia», contestado brillantemente por Fernández Cruz, quien terminó sus palabras con una aseveración tajante que guardo para el recuerdo: «Hoy ha entrado en la Academia, además de la alta medicina, la alta matemática». Siendo Decano de Medicina de la Complutense, intensifiqué con él mi relación, como Profesor Encargado de Curso, y siempre me encontré con un hombre correcto y comprensivo con los problemas docentes que le exponía en mis idas al Decanato.

Fue una persona excepcional que aunó la ciencia con la fe cristiana, cobijándole ésta y acompañándole en un tránsito de paz, el 30 de julio de 1986.

D. Bonifacio Piga Sánchez Morate (I. 1979): El último de esta relación, pero de los primeros en mi afecto. El prototipo del hombre bueno. Amigo de los amigos y de los que no lo eran. Se alegra-

ba de los éxitos ajenos elevando el diapasón de su felicitación, y ponía sordina a los fracasos disculpándolos. ¡A cuántos compañeros ayudó, con generosa bondad aunque siempre dentro de su rectitud, en los años que presidió la Comisión Deontológica del Colegio de Médicos de Madrid!

Hijo de un padre prestigioso, el Catedrático de Medicina Legal y Forense de la Universidad Central, D. Antonio Piga Pascual, y padre de un hijo, también importante en prestigio profesional, el Dr. Piga Rivero, Profesor de esta disciplina y de la de Bioética, en la Universidad de Alcalá de Henares. Tardó varios años en suceder al progenitor en la Cátedra y en el sillón académico, ya que en ambos puestos se le anticipó D. Ricardo Royo Villanova, otro ilustre amigo.

De Bonifacio Piga, quizá se desconozca por muchos compañeros dos intervenciones suyas, cuya singularidad y proyección profesional le colocan, con evidente protagonismo, dentro de una memoria histórica pasada. Ayudando a su padre, practicó en el año 36 la autopsia al cadáver de don José Calvo Sotelo, y en 1975, ésta vez ayudado por su hijo Antonio, procedió al embalsamamiento del cuerpo sin vida del General Franco.

El profesor Piga fue un Académico ejerciente, con activa presencia en todas las Sesiones, en las que gustaba de intervenir con erudición de conocimientos. Con motivo de presentar quien les habla una comunicación titulada «Reflexiones sobre la Eutanasia», me hizo el honor de apostillar mis palabras con juicios profundos y valiosos, que luego me servirían para ampliar mi texto en futuras publicaciones.

Murió a los 83 años de edad, culminando una vida fecunda para la Ciencia y el comportamiento humano. Su evocación hoy genera lágrimas en los que fuimos sus amigos, pero las lágrimas son, a veces, bálsamo para el recuerdo y no para la pena.

He tratado de condensar en 30 minutos, secuencias y recuerdos de cinco largos lustros, cuyos protagonistas hacen buena la sentencia de Cicerón: «El recuerdo de los muertos está en la memoria de los vivos».

A los que la Providencia nos ha hecho la merced de sobrevivir, hemos de compensar este privilegio con el deber de recordar a los

que nos precedieron, que hoy nos regalan el aleteo de sus espíritus por este salón de la Academia en que un día aletearon sus cuerpos.

Vivimos un presente, pero ello nos obliga a vivir también el recuerdo del pasado, porque si no la vida no merecería la pena de ser vivida. Oigamos a aquel fino poeta indio Omar Khayyan: «Dices que cada nueva mañana nos trae mil rosas; sí, pero ¿dónde están los pétalos de la rosa de ayer?».

Los amigos del recuerdo son los pétalos de ayer, que siguen regalándonos el perfume de la vieja amistad.

Muchas gracias.

INTERVENCIONES

Prof. Lucas Tomás

Creo que es muy interesante lo que acaba de suceder en el día de hoy; estamos aquí reunidos para hablar de ciencia, pero también es cierto que de vez en cuando hay que hablar de amistad, y creo que la conferencia del Prof. Cruz Hermida ha sido realmente emotiva, porque es muy bueno recordar a los buenos amigos y todo lo que ha pasado; estamos aquí porque antes sucedió algo, ellos mantuvieron la Academia y nos la entregaron y, por lo tanto, estamos aquí gracias a ellos. De alguno de ellos no conocemos más detalles que el nombre y la fecha. Quiero ampliar un poco más lo que ha dicho del Prof. Calatrava Páramo, que ocupó este asiento; era cirujano maxilofacial y creador de la cirugía maxilofacial junto con otras personas en los años 60, en ese momento en que la estomatología se transformaba, pasaba los límites convencionales, ampliando su área de la cirugía constituyendo la cirugía maxilofacial.

Yo me consideré amigo suyo, aunque el Prof. Calatrava trabajaba en el Hospital del Aire y yo entonces en la Clínica de la Concepción y yo sería la segunda generación de esa cirugía maxilofacial que se creara entonces. Lo importante es que él, junto con otras personas, crearon la figura de la cirugía maxilofacial y la introdujeron en España, cosa que es importante que la reconozcamos, y junto con el matiz profesional una gran capacidad técnica-quirúrgica; era un gran cirujano porque era un gran médico que sabía mucho de diagnóstico clínico y diagnóstico diferencial, y además, operaba. Hay un matiz personal que sería interesante conocer, es

que tenía una personalidad definitoria absoluta. Era un hombre que entendía las cosas inmediatamente y delimitaba perfectamente donde estaba el diagnóstico y donde estaban sus amigos. Muchos lo recordarán por la contundencia con la que manejaba las palabras, las frases, los diagnósticos y las amistades. Yo me acuerdo de una frase suya que decía «no aguanto a los estúpidos»; era un hombre muy cariñoso, muy simpático, muy cordial, pero de una rotundidad en sus manifestaciones y en sus criterios que llamaban la atención. Muchas gracias por tus palabras.

Prof. Martínez Fornés

Has citado a Eugenio D'Ors y quiero felicitarte con una frase que le oí personalmente «una síntesis vale por diez análisis». Realmente una síntesis es difícil; cada uno de los personajes que has citado requeriría una conferencia entera y es difícil poner freno a tu corazón generoso en este texto. Realmente, con cuatro pinceladas, las numerosas personas que no hayan tenido el privilegio de conocer a todos estos personajes, se llevan una idea bastante exacta. Te felicito por un texto tan bien escrito, tan generoso, y maravillosamente leído.

Prof. Sierra García

Quiero muy brevemente matizar tres aspectos. El primero, darle la enhorabuena por su magnífica conferencia. En segundo lugar, quería agradecerle el que me haya citado, porque en el año 1980 quedaron dos plazas vacantes en la sección de Cirugía y los dos Académicos que ocupamos esas plazas fuimos el Prof. Cruz Hermida y yo. Como los dos en estos días cumplimos nuestras bodas de plata, siempre es agradable que al menos te citen, incluso que te regalen un libro como él me ha regalado. Es duro que uno cumpla las bodas de plata en cualquier institución o centro y que nadie le diga nada. A mí, la conferencia del Prof. Cruz Hermida me ha servido en este aspecto para que se me haya recordado, por lo cual yo se lo agradezco. En tercer lugar, quería, después de 25 años como Académico Correspondiente, dar mi punto de vista sobre esta entidad dentro de la Real Academia. Creo que la personalidad del Académico Correspondiente es una personalidad importante para mí,

porque en el año 1979, cuando convocaron estas dos plazas, fue un concurso nacional, libre, en el que había que aportar la historia profesional del individuo junto con un trabajo de investigación inédito. Cuando fui nombrado, para mí fue un momento importante dentro de mi vida; yo me acuerdo que al Presidente de entonces le pedí que quería trabajar en la Real Academia y me contestó que, como yo era cirujano, que hablara de lo que yo más conocía. Le contesté que era la cirugía y la patología de la mama y entonces hasta ahora, cada dos años aproximadamente, he dado una conferencia en esta Institución sobre temas relacionados con la patología mamaria; la última hace pocos meses sobre el tratamiento del cáncer de mama en el tercer milenio. Espero, y ya se lo he dicho al Prof. Jiménez Collado, que mi último libro que me encargó la Sociedad Española de Cirujanos, una guía clínica de cómo deben actuar los cirujanos españoles, la presentaré en el mes de febrero, si Dios quiere.

Sn embargo, quiero hacer un poco hincapié en que muchas veces los Académicos Correspondientes somos algo olvidados en esta casa, y como muestra me voy a referir a un botón que tiene la actualidad de estos días. Hace poco recibí en casa una carta de la Real Academia Nacional de Medicina en la que venía un folleto con un curso sobre patología mamaria; lo vi con sorpresa, miré los temas y las personas que lo impartían, que eran totalmente ajenas a esta Institución. Valga este botón de muestra y ejemplo para pedir a la Dirección y a la Presidencia de la Real Academia Nacional de Medicina que cuente cada vez más con los Académicos Correspondientes, sobre todo como el Prof. Cruz Hermida y como yo, que llevamos veinticinco años y que seguimos con ganas de trabajar, y Dios sabe si, además de cumplir las bodas de plata, llegamos a cumplir las bodas de oro. Muchas gracias por tu magnífica conferencia.

Prof. Jiménez Collado

Quiero felicitar al Prof. Cruz Hermida por la magnífica conferencia que nos ha dado. He de responder al Prof. Lucas Tomás, que ha hablado de la idoneidad de una sesión de recuerdo a nuestros mayores; en la próxima Junta de Gobierno se dará cuenta que la Junta Directiva ha establecido un memorial a modo de lo que ocurre en Academias de Estados Unidos, Inglaterra, Francia e Italia, en el cual va a haber una sección específica para recordar los cien años

de toma de posesión como Académicos en esta Academia. Es una idea que había que institucionalizarla, y para ello es necesario que haya un acuerdo en la Junta Directiva, que pase a la Junta de Gobierno y que ésta se dé por enterada.

También el Prof. Lucas ha hablado de un querido amigo, que cuando yo era Catedrático en Murcia me lo encontraba muchísimas veces en La Manga. Me refiero al Prof. Orts Llorca. El Prof. Cruz Hermida ha hecho una síntesis preciosa, magnífica, pero corta, porque el Prof. Orts Llorca, además de ser mi maestro y yo he sido su discípulo desde que tenía dieciséis años en Cádiz, he sido su continuador en Madrid, le he sucedido. El Prof. Orts Llorca creó la primera Escuela de Embriología Experimental en España, el primero que hizo los injertos y traslaciones de células marcadas con timidita en Europa. La colección de embriones del Prof. Orts Llorca, de la que soy su depositario, ya que me la legó en su testamento, es maravillosa, ha sido y sigue siendo de las mejores en nuestro país. Hay otra faceta del Prof. Orts Llorca que no ha comentado, y es que en Cádiz tuvo una labor ímproba, ya que llegó allí con medios muy limitados, hizo una Cátedra maravillosa, unos laboratorios en los que había que hacer los cultivos con estufas de petróleo y algo más, fue cirujano; en Cádiz hubo una época de nueve años en la que no hubo Catedráticos de Cirugía, y él tenía asimiladas las dos Cátedras de Patología Quirúrgica. El Prof. Orts Llorca ha sido un padre, y fundamentalmente ha sido un caballero, en la máxima extensión de la palabra. La Avenida del Prof. Orts Llorca tuvo la suerte, junto con la del Prof. Pérez Llorca, de hacer su inauguración.

En cuanto al amigo Prof. Sierra, permítame que como miembro de la Junta Directiva no esté de acuerdo con lo acabas de decir. Hace meses dije que había que hacer un control de los Señores Académicos Correspondientes por una razón, porque no vienen. ¿Cuántas veces en este año académico que termina el 13 de diciembre has estado aquí? Han sido tres veces; el Prof. Cruz Hermida ha estado sólo dos. Los Académicos de Número tenemos un libro de firmas en el que se hace fechaciente la asistencia a las sesiones; yo propuse que hubiera un libro de firmas para los Académicos Correspondientes, y se va a hacer a partir del próximo Curso Académico que se inicia el 17 de enero.

Antes de ser Académico de Número venía yo de vez en cuando a las sesiones científicas y, si mal no recuerdo, actuaban prácticamente los Académicos de Número. Ahora es rara la sesión en la que

no interviene un Académico de Número y uno Correspondiente. Por tanto, no es que se les quiera y no se les desprecie, sino que la presencia hace la existencia. En cuanto al curso que ha hecho el Prof. Escudero, fue potencializado por la Real Academia Nacional de Medicina, que se lo da a un Académico y éste se hace responsable del mismo, teniendo la obligación de rendir cuentas; ha tenido una acogida y unos medios de difusión y aceptación. La Real Academia Nacional de Medicina, bajo ningún sentido, se olvida de sus integrantes, sean numerarios, sean correspondientes de Madrid o de provincias. Aquí todos los años vienen Academias de Distrito, y hace una semana estuvo aquí la Real Academia de Medicina de Cádiz. En esta Academia se os quiere, se os estima y se os aprecia, pero, por favor, integrémonos todos más, porque una familia dispersa no es bien avenida, y queremos convivir, queremos integrarnos y queremos ser una unidad.

CONTESTACIÓN DEL PROF. CRUZ Y HERMIDA

Quiero agradecer a todos los Académicos que me han honrado con su intervención sus generosas palabras.

Al Prof. **Lucas Tomás**, con el que coincidido en tantas cosas, celebro que coincidamos en la común amistad con Luis Calatrava Páramo, de la que ambos nos sentimos orgullosos.

Al Prof. **Martínez Fornés**, miembro de Academias hermanas, agradecer que haya aportado, con sus palabras, bellas expresiones de Humanismo Médico, con citas dorsianas incluidas.

Al Prof. **Antonio Sierra** también le agradezco su vibrante intervención, al tiempo que le felicito también por ser otro feliz testigo personal en el cumplimiento de Bodas de Plata con la Academia.

Finalmente, al Prof. **Jiménez Collado**, decirle que coincidido plenamente con él en que he hecho una obligada «síntesis corta» del admirado Prof. Orts Llorca, pecado que he cometido también con el resto de amigos citados, ya que todos hubieran merecido un comentario más extenso. El breve y preceptivo tiempo de que disponemos todos los conferenciantes tiene la culpa, pero en este caso puntual, el Prof. Jiménez Collado, con sus sentidas palabras hacia su maestro ha suplementado, en parte y con justicia, mi breve cita al gran anatómico y maestro de todos. Le agradezco su oportuna aportación.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

Por muchos motivos esta sesión ha sido singular, al menos yo así lo he sentido y por eso lo digo. El valor de sus conferenciantes, como siempre, espléndido. Hay que agradecer a los dos ponentes de hoy; al Prof. Jiménez Collado por su doble trayectoria, interviniendo en las dos conferencias; ha estimulado al máximo nuestra capacidad perceptiva de los hechos anatómicos embriológicos que conocemos de antiguo, y que de vez en cuando tenemos que leer para nuestro conocimiento. Ha sido una ponencia estupenda, difícilísima para construir y entender y ensamblar con los conocimientos de los aspectos generales de la medicina, hay que profundizar en esas cosas que están en la embriogenia. Como miembro de esta Academia te agradezco el esfuerzo enorme que para mí ha supuesto la elaboración de la ponencia con la que nos has obsequiado, cómo hay que concretar cuestiones de la embriogenia que puedan ser escuchadas y aprovechadas en aquellos casos que podamos hacerlo. Muchas gracias por tu magnífica conferencia.

Al Prof. Cruz Hermida muchas veces le hemos escuchado. Una de sus características más importantes es la capacidad que tiene de pensar, de manifestar lo pensado, de comparar, de estuchar tus sentimientos, de evocar lo que en el recuerdo tienes, y has hecho una conferencia magistral. Has hablado de los grandes maestros de nuestra Facultad de Medicina, y algunos otros que estaban alejados de Madrid, pero a la vez presentes y en la actuación de esta Academia. No es nada fácil valorar aquellas cuestiones que se refieren al sentimiento, pero si de eso hablamos, es la valoración de esa historia en lo que yo conozco, que son muchos años porque terminé en el año 1945 en la Facultad de Medicina de Madrid. Has recordado de una manera extraordinaria a todos aquellos maestros; has estimulado nuestros sentimientos, porque te hemos escuchado muchos que entonces estábamos como auxiliares, como médicos internos, de muchos profesores que ha tenido gran suerte la Universidad Complutense en tener, un magnífico grupo de profesores, distinguiéndose totalmente en todas y cada una de las parcelas a las que se dedicaban. Has relatado con gran realidad y conocimiento a las personas y a las instituciones. Nos has emocionado a todos.

Se levanta la sesión.

XX SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 22 DE NOVIEMBRE DE 2005

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

**SÍNTESIS COMBINATORIA:
UNA NUEVA METODOLOGÍA EN QUÍMICA MÉDICA**
***COMBINATORIAL SYNTESIS: AN IMPORTANT
METHODOLOGY IN MEDICINAL CHEMISTRY***

Por el Excmo. Sr. D. CARLOS SEOANE PRADO

Académico de Número

**META-EFECTO DE LA PROFILAXIS QUIRÚRGICA.
PREVENCIÓN DE LA NEUMONÍA
POST-QUIRÚRGICA PRECOZ**
EARLY-ONSET POST-SURGICAL PNEUMONIA

Por el Ilmo. Sr. D. RAFAEL HERRUZO CABRERA

Académico Correspondiente

**SÍNTESIS COMBINATORIA:
UNA NUEVA METODOLOGÍA EN QUÍMICA MÉDICA**
***COMBINATORIAL SYNTESIS: AN IMPORTANT
METHODOLOGY IN MEDICINAL CHEMISTRY***

Por el Excmo. Sr. D. CARLOS SEOANE PRADO

Académico de Número

Resumen

Para el químico sintético, la Síntesis Combinatoria consiste en el empleo de procesos (síntesis en fase sólida) y estrategias (centenares o millares de reacciones simultáneas) que permiten, en muy breve tiempo, la obtención de colecciones grandes y organizadas de compuestos orgánicos, las llamadas bibliotecas moleculares o »quimiotecas«. Sin necesidad de aislamiento y purificación de los compuestos individuales, pueden, mediante la llamada «deconvolution», evaluarse como mezcla para determinar la actividad biológica.

Estas quimiotecas, planeadas sistemática e inteligentemente, se están convirtiendo en una fuente imprescindible para el descubrimiento y desarrollo de nuevos principios activos para la farmacología. Generan compuestos estructuralmente diversos que, combinados con los nuevos ensayos de alto rendimiento sobre receptores («high throughput screening»), permiten la búsqueda de cabezas de serie farmacológicos con una rapidez sin precedentes. Por su parte, la llamada síntesis combinatoria paralela logra una eficaz optimización estructural del cabeza de serie mediante la preparación, individual pero simultanea, de una amplia gama de derivados de la estructura progenitora.

Abstract

From the stand point of the synthetic chemist, Combinatorial Synthesis involves the use of processes (solid phase synthesis) and strategies (hundreds or thousands of simultaneous reactions) which allow the preparation, in a

short time, of big, organized collections of organic compounds, the so called molecular libraries. Without isolation or purification of individual compounds, deconvolution allows the evaluation of mixtures for biological activity.

These libraries, if smartly designed, are becoming an essential source in the discovery and development of new molecules for pharmacology. The structurally diverse compounds are submitted to high throughput screening in a rapid search for lead compounds. On the other hand, the so called parallel combinatorial synthesis offers an efficient route for the structural optimisation obtaining, individually but simultaneously, a wide variety of derivatives of the lead compound.

INTRODUCCIÓN

El largo y complejo proceso que se requiere para lograr un nuevo fármaco supone una decena de etapas ideales (Patrick, 2001), en varias de las cuales desempeña la síntesis orgánica (Borrell, 1999) un papel clave (Figura 1).

La utopía Químico-Médica

1. Elección de la enfermedad e identificación de su diana terapéutica
2. Creación del bioensayo adecuado para ella
3. **Hallazgo y síntesis de la molécula cabeza de serie**
4. **Optimización en estructura-actividad**
5. Identificación inequívoca del farmacóforo
6. Logro de perfecta interacción con la diana
7. Determinación de la farmacocinética, metabolismo y toxicidad
8. **Diseño de la síntesis a escala industrial**
9. Ensayos clínicos
10. Comercialización

FIGURA 1.

En la decisión química inicial, el hallazgo de una molécula con actividad biológica, aunque sea débil, que sirva como cabeza de serie, los químicos, médicos y farmacólogos se han valido históricamente de datos previos procedentes de fuentes tan dispares como el folklore curativo de los productos naturales o el ensayo farmacológico ciego de moléculas originalmente obtenidas sin propósito médico (Madden, 1994; Vermuth, 1996) (Figura 2).

«Yacimientos» en la Química del descubrimiento de fármacos

- Productos naturales
- Ensayos farmacológicos a ciegas de moléculas sintéticas
- Modificaciones químico-estructurales de moléculas ya activas
- Descubrimiento accidental de actividad
- Búsqueda informática en bases de datos estructurales
- Diseño «racional» basado en la estructura del receptor
- Diseño basado en la estructura del ligando metabólico del receptor
- Creación *ad hoc* de grandes «bibliotecas moleculares»: Síntesis combinatoria.

FIGURA 2.

La Química Terapéutica, junto con la Medicina y la Farmacología, están haciendo la transición del empirismo a la racionalidad en el diseño de fármacos, hasta ahora muy dependiente de descubrimientos accidentales. Una de las principales contribuciones a este proceso es la Síntesis Combinatoria (Nicoli, 2005). La razón es que el químico terapéutico ha de manejar números ingentes de estructuras moleculares. Y el número de posibles moléculas orgánicas es inabarcable (Elguero, 1999).

En la creación de un nuevo fármaco, para seleccionar la molécula apropiada entre millones, lo ideal sería conocer previamente la estructura química necesaria. Para ello sería preciso conocer de antemano el receptor biológico para ese fármaco y todos los aspectos metabólicos implicados. Por desgracia, esto no es posible en la mayoría de los casos. Mucho se ha avanzado en el terreno de la relación estructura-actividad, pero mucho más nos falta por saber. Químicos y farmacólogos nos vemos obligados a hacer muchas moléculas, cuantas más mejor, y ensayar la actividad biológica de todas y cada una, identificar un cabeza de serie y refinar después su estructura hasta el fármaco médicamente útil (Balay, 1999). ¿Podemos evitar sintetizarlas una a una, trabajosa y lentamente? Ya podemos, con la Química Combinatoria.

QUÍMICA COMBINATORIA: POR QUÉ, QUÉ Y COMO

En los últimos años se ha producido un vertiginoso incremento en el número de dianas terapéuticas conocidas. Como consecuencia, aparecen más y más posibilidades para tratar dolencias hasta ahora inabordables, lo que requiere muchas nuevas moléculas orgánicas capaces de actuar sobre esa pléyade de nuevas dianas.

Ahora bien, aún con todos los avances actuales, de cada 10.000 estructuras moleculares ensayadas con fines terapéuticos, solo una llega a ser un medicamento utilizable. Con tal proporción, es evidente que se requiere una metodología que permita la síntesis de un enorme número de moléculas si hemos de tener probabilidades razonables de éxito. Necesitamos metodologías de síntesis masiva que permitan obtener nuevas moléculas orgánicas en número y diversidad hasta ahora impensables. Esta es la razón de la Síntesis Combinatoria, que podemos definir como un *conjunto de estrategias y procesos que permiten lograr la síntesis rápida y simultánea de una colección grande y organizada de compuestos orgánicos*: las llamadas bibliotecas moleculares o quimiotecas (Arya, 2005).

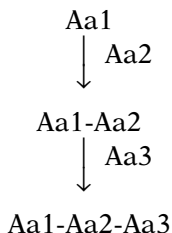
Obtenidas estas quimiotecas, de centenares o millares de compuestos, pueden someterse al ensayo masivo de cribado («screening»), que en muy poco tiempo permiten identificar la o las pocas moléculas con la actividad farmacológica buscada. Se ha hecho un paralelismo entre la Química Combinatoria y el sistema inmunológico, capaces ambos de seleccionar una molécula concreta entre muchísimas.

¿Cómo se lleva a cabo una síntesis combinatoria? Se realiza en cada síntesis un solo tipo de reacción química, pero combinando *simultáneamente* un gran número de sustratos y reactivos. En otras palabras, se llevan a cabo una multitud de reacciones análogas simultáneas para obtener una colección de moléculas de una misma familia estructural. Y el trabajo se lleva a cabo en microescala y con técnicas sintéticas en fase sólida (Seoane et al., 2002; Burgess, 1999), que permiten gran automatización y robotización en el laboratorio de síntesis orgánica y que valieron el Premio Nobel de Química a Merrifield, su descubridor (Merrifield, 1993).

EJECUCIÓN DE UNA SÍNTESIS COMBINATORIA

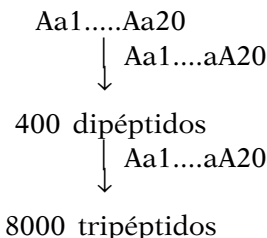
La síntesis de péptidos (Howl, 2005; Jiménez, 2004) nos permitirá presentar las ventajas de la síntesis combinatoria.

La síntesis *clásica* de un tripéptido requiere una secuencia en la que cada residuo de aminoácido se va adicionando, con las adecuadas protecciones y desprotecciones de los grupos funcionales, en reacciones sucesivas. Al completarlas, habremos obtenido un compuesto, el tripéptido Aa1-Aa2-Aa3:



Si necesitásemos el péptido Aa2-Aa1-Aa3, tendríamos que realizar una nueva y diferente secuencia de reacciones. Y así una y otra vez para cada tripéptido que queramos.

La síntesis combinatoria, por el contrario, permite obtener muchos péptidos distintos de un solo golpe. Podemos acoplar en una síntesis combinatoria un sustrato formado por 20 aminoácidos diferentes, que se hacen reaccionar con otra mezcla de otros tantos, con la protección funcional adecuada. De esa única reacción obtendremos directamente 400 dipéptidos. Si esos 400 dipéptidos se hacen reaccionar de nuevo con la mezcla de 20 aminoácidos, obtendremos 8.000 tripéptidos, con muy poco esfuerzo y en un tiempo muy breve:



Habremos obtenido, de un golpe, una quimioteca combinatoria, cuyas dimensiones pueden ser enormes y aumentarán con el número

de moléculas de partida y, con ellas, el de reacciones simultáneas: N reactivos actuando sobre N sustratos darán $N \times N$ estructuras moleculares diferentes. Dicho de otro modo, el número de péptidos aumenta exponencialmente con su longitud.

La síntesis combinatoria puede ejecutarse de dos modos distintos. La primera posibilidad es hacer que cada producto individual sea obtenido en un vial de reacción diferente, un proceso conocido como síntesis paralela, originada con la llamada «técnica de la bolsa de té» de Houghten (1985) y luego automatizada con métodos robóticos adecuados. La síntesis paralela es un excelente método para la optimización estructural de fármacos, una vez que se ha identificado la molécula prototipo, el cabeza de serie. Se pueden obtener así con rapidez un gran número de análogos para, en función de la correlación estructura-actividad, seleccionar el que mejor actividad tenga para convertirlo en el fármaco definitivo.

Pero la segunda, y más importante, alternativa consiste en ejecutar la síntesis combinatoria en un solo matraz, de modo que en un único recipiente de reacción se genere la quimioteca entera. Es este el camino que la Química Combinatoria sigue para la tarea más difícil: el hallazgo del cabeza de serie. Los ensayos sobre una gran quimioteca de compuestos orgánicos en busca del *uno* que es activo se ha comparado con la proverbial búsqueda de la aguja en el pajar. La Química Combinatoria nos permite encontrar las agujas mucho más deprisa. De hecho, la necesidad antes aludida de encontrar cada vez más estructuras prototipo para nuevas dianas terapéuticas ha sido el principal acicate para el actual desarrollo de la síntesis combinatoria.

Mientras que en el pasado aún reciente el motor de la Química Médica era el descubrimiento, muy aleatorio, de un cabeza de serie, ahora el motor es el descubrimiento de la diana terapéutica, del receptor farmacológico. Se estima que una gran compañía farmacéutica podrá seleccionar cada año un centenar de dianas terapéuticas y buscar cabezas de serie para cada una de ellas. Ello exigirá sintetizar y ensayar más de un millón de moléculas distintas. Solo la Química Combinatoria ofrece el modo de generar y ensayar, en tiempos viables, tales colecciones de nuevos compuestos químicos.

De este modo, el químico sintético se encontrará con un matraz que contiene una colección, como mezcla, de muchos compuestos

distintos¹. Si uno de los compuestos contenidos en la mezcla fuese activo él, y solo él, la aguja en el pajar, se asociaría *in vitro* con nuestro receptor mediante una interacción fármaco-receptor, en definitiva una forma de «reconocimiento molecular» por asociación no covalente con la «plantilla» molecular (Figura 3).

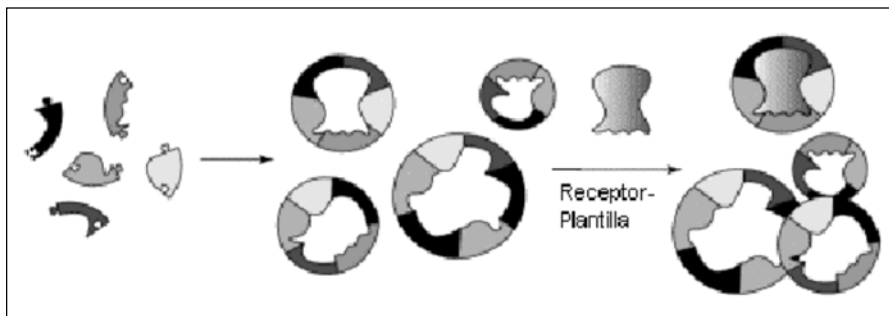


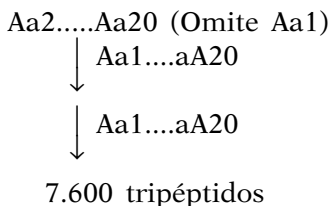
FIGURA 3.

La quimioteca completa se enfrenta al receptor. Si no se observa actividad es que *todas* la moléculas presentes en la mezcla son inactivas y, con un solo experimento, evitamos tener que ensayar individualmente cada uno de esos productos. Todos ellos, centenares o quizás millares, se descartan de una sola vez, ahorrándonos así el esfuerzo y el tiempo de sintetizar, purificar y caracterizar cada componente.

Se puede pasar enseguida a la siguiente quimioteca, hasta que una de esas mezclas muestre actividad. Ésta es la fase clave, una metodología que debe tanto a la Matemática Combinatoria como a la propia Química. Viene usándose para ella el término inglés «deconvolution»² y permite la identificación del compuesto concreto que es activo. Para ello, se procedería a sintetizar de nuevo la quimioteca, pero comenzando solo con 19 aminoácidos sustrato en lugar de los 20. Tras el acoplamiento con 2 veces 20 aminoácidos llegaremos a un matraz que, en lugar de 8.000, contendrá 7.600 tripéptidos:

¹ Hemos de reconocer que para un investigador químico tradicional, cuyo objetivo es obtener una sola e identificable sustancia que debería ser aislada y purificada, esta situación resulta nueva. El énfasis combinatorio está, efectivamente, en manejar mezclas de muchas moléculas cuya estructura no necesariamente se conoce con precisión y los compuestos no se aíslan ni purifican.

² Su traducción al español presenta un interesante problema lexicográfico a nuestra institución hermana, la Real Academia Española.



Si, al ensayar de nuevo su actividad biológica frente al receptor, la mezcla resulta inactiva, sabremos que el compuesto activo es uno de los 400 que faltan. Más aún, sabemos que la posición 1 del tri péptido activo es precisamente el aminoácido Aa1, el que hemos omitido al usar sólo 19. Si, por el contrario, esa quimioteca de 7600 compuestos sigue siendo activa hemos de continuar omitiendo sistemáticamente, en el sustrato inicial, cada uno de los aminoácidos hasta el Aa20. Así encontraremos el bloque de 400 compuestos que contienen la molécula activa. Y eso con un máximo de 20 experimentos, que nos permiten determinar inequívocamente qué aminoácido ocupa la posición 1. Con esta posición ya conocida, como máximo otros 20 experimentos de omisión nos permitirán identificar el fragmento de la posición 2 y otro tanto ocurrirá con el tercer y último fragmento.

En consecuencia, sólo $20+20+20=60$ experimentos, como máximo, de omisiones sucesivas habrán sido necesarios para definir la estructura molecular completa de un nuevo fármaco entre nada menos que 8000 candidatos. Un excelente avance químico, que expresa la ventaja matemática de lo lineal ($20+20+20$) sobre lo exponencial ($20 \times 20 \times 20$) que la síntesis clásica hubiese requerido (Hangauer, 2001). En ello consiste la esencial y gigantesca ventaja de la Síntesis Combinatoria en la búsqueda de nuevos medicamentos (Wilson, 1997).

APLICACIONES Y LIMITACIONES DE LA SÍNTESIS COMBINATORIA

El éxito de una síntesis combinatoria exige dos requisitos fundamentales. En primer lugar, las reacciones sintéticas que se utilicen han de ser rápidas y de alto rendimiento, para que se pueda obtener eficazmente la quimioteca. Igualmente han de serlo las reacciones de protección-desprotección de grupos funcionales. En se-

gundo lugar, los ensayos de actividad biológica han de ser también sencillos y rápidos para procesar los grandes números de compuestos que aportan las quimiotecas y en esto son fundamentales los ensayos *in vitro* automatizados sobre receptores aislados (Kyranos, 2004). Tanto estos ensayos como la síntesis combinatoria se hacen hoy por procedimientos robotizados controlados informáticamente (Bayer, 2005; Cawse, 2001). Trabajando ininterrumpidamente («high throughput screening»), es posible hoy llegar a sintetizar y ensayar en una semana hasta 10.000 nuevas moléculas³ y con cantidades muy pequeñas, de orden de microlitros. La farmacología ha pasado así de ser el factor limitante, el proceso lento, a convertirse en el verdadero motor, un dragón insaciable que demanda más y más moléculas para ensayar, haciendo ya imprescindible para los químicos la Síntesis Combinatoria.

La aplicación práctica de la Química Combinatoria puede dificultarse si en una quimioteca existe más de un compuesto activo, más de una aguja en el pajar, en palabras de Wilson (1997), lo que complica la sistemática y hace precisos más experimentos adecuadamente diseñados. En este sentido, resulta obvia la importancia de los aspectos bioinformáticos de esta revolución de la Química Médica y el tratamiento de las enormes bases de datos que lleva inevitablemente aparejadas.

Para volver a nuestras grandes cifras, se ha calculado que, sólo con masas moleculares por debajo de 850 Dalton, rango en el que se encuentran la mayoría de los fármacos, son posibles 10²⁰⁰ sustancias químicas diferentes. Como, evidentemente, no es posible sintetizar quimiotecas de tal dimensión, se hace preciso decidir que familias químicas se han de incluir. El conocimiento químico-biológico de la relación estructura-actividad sigue siendo de capital importancia, cada vez también con mayor ayuda informática en el tratamiento de los parámetros de modelización molecular de la estructura, esquemas de sustitución, parámetros físico-químicos, subunidades farmacóforas o interacciones fármaco-receptor.

Originariamente, la Síntesis Combinatoria se apoyó en la síntesis de péptidos, quizá porque la metodología para su síntesis en fase sólida estaba ya desarrollada y creó una vía excelente que complementaba muy bien a otros métodos de preparación de péptidos terapéuticos, caros y complejos, como el uso de microorganismos

³ Los últimos sistemas robotizados apuntan ya capacidades de ensayo *in vitro* de decenas de miles de moléculas diarias.

recombinantes o plantas transgénicas. De este grupo de fármacos peptídicos resultaron nuevos ligandos para receptores opiáceos, nuevos agentes antimicrobianos y alguno de los más recientes fármacos para el virus de inmunodeficiencia humana, el Fuzeon, un péptido de 36 aminoácidos de la familia de los inhibidores de fusión (Sriram, 2005). La síntesis combinatoria en fase sólida ha permitido que el número de péptidos sintéticos de aplicación terapéutica, tan solo una decena en 1990, se haya cuadruplicado en una década y se doblará probablemente en el próximo lustro.

Junto con sus ventajas en tanto que agentes terapéuticos, como su no acumulación en el organismo debido a su rápido metabolismo, los péptidos presentan también inconvenientes en su uso como fármacos. Requieren formas de administración incómodas, por su escasa actividad por vía oral debida a su metabolización por los enzimas digestivos y, en especial los de baja masa molecular, tienden a ser prematuramente filtrados por el riñón. Por ello, la segunda generación contempla el uso de péptidos no proteinógenos y la modificación de péptidos por reacciones como la N-metilación o peptoides cuya cadena lateral está unida al N en vez de al carbono. El problema renal intenta resolverse mediante el incremento de la masa molecular por conjugación con moléculas de tamaño suficiente, sin alterar la estructura funcional del péptido.

La Síntesis Combinatoria va hoy mucho más allá del acoplamiento peptídico y puede aplicarse a la mayoría de las reacciones orgánicas de valor sintético, incluido el uso de reactivos organometálicos, condensaciones aldólicas, reacciones de Wittig, acoplamientos de Heck y de Stille o la reacción de Mitsunobu. Por otra parte, la secuencia sintética combinatoria se ve con frecuencia acortada y mejorada mediante el uso de reacciones dominó (Capdevilla, 2003, Waldmann, 1995) y reacciones multicomponente (Weber, 1999). Como consecuencia de todo ello, hoy son asequibles por síntesis combinatoria fármacos de muy diversas estructuras, muy especialmente moléculas de naturaleza heterocíclica. La figura 4 muestra un caso paradigmático con la síntesis de nuevas 1,4-diazepinas, un tipo de moléculas bien conocido por la Psiquiatría (Patrick, 2001). Se trata de una síntesis combinatoria ideal, ya que implica la unión de tres subunidades diferentes y la presencia de 5 substituyentes en posiciones variables, de modo que se llega a una quimioteca a partir de una estructura básica con un producto de partida común (Figura 4).

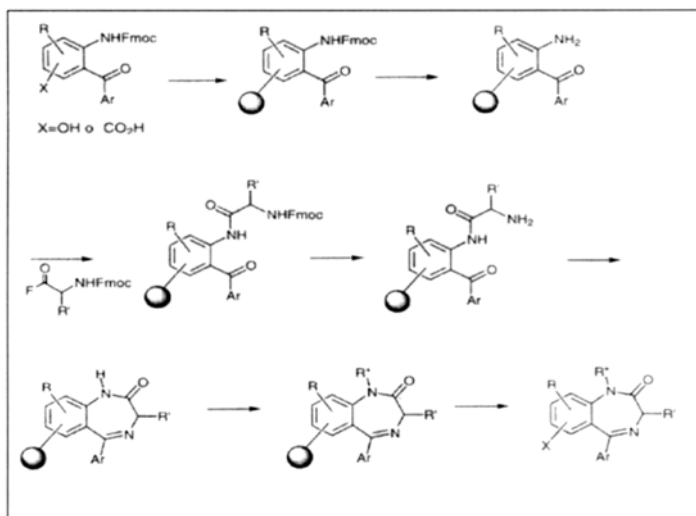


FIGURA 4.

Se publican continuamente nuevos ejemplos con estructuras como piperazinas, triazolinas y muchas otras. La idea clave es siempre partir de un esqueleto base⁴ y realizar sobre él multitud de variaciones estructurales (Figura 5).

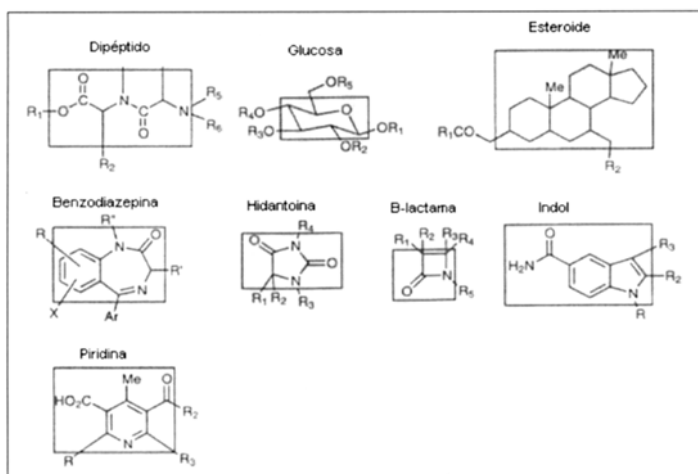


FIGURA 5.

⁴ Viene utilizándose para designarlo el término «scaffold», de la terminología inglesa, que podríamos traducir por «andamiaje» o «estructura soporte».

Ha de resaltarse aquí la importancia de dedicar un tiempo previo a la optimización de la secuencia de reacciones antes de emprender la síntesis de una biblioteca heterocíclica combinatoria. De no hacerlo, algún paso de la secuencia sintética en fase sólida podría generar productos indeseados y, al no ser posible analizar con facilidad lo que está ocurriendo en las esferas del soporte polimérico, podríamos encontrarnos con una quimioteca que contenga centenares de sustancias inútiles antes de haber identificado el problema. Esto puede evitarse confirmando antes la viabilidad de la reacción en fase sólida con algunos compuestos individuales extremos, como son las estructuras con mayores dificultades estéricas o electrónicas y evitando el uso de especies de muy baja reactividad.

Los avances más recientes en el diseño de quimiotecas combinatorias se dirigen a la búsqueda de un alto grado de diversidad estructural, que permite cubrir un amplio campo en el examen de actividades farmacológicas. En este sentido, habrá de irse guiando, cada vez más, no solo por descriptores estructurales, si no por descriptores de actividad biológica (Congreve, 2005). Esto puede lograrse en la práctica ensayando todos los compuestos de una quimioteca frente a un panel de proteínas funcionalmente diferentes y determinando la afinidad como ligando de cada compuesto para cada proteína. El conjunto de afinidades de un compuesto dado es su «huella dactilar», que correlaciona bien con las actividades biológicas de los compuestos ensayados como fármacos potenciales.

Pero tal vez el futuro se encuentre en la Química Combinatoria Dinámica (Stoddart, 2002). Los procesos descritos hasta ahora se basan en un fenómeno que podríamos considerar estático, mediante reacciones sintéticas irreversibles. Por tanto, cuando una quimioteca se enfrente a un receptor y sólo uno de los compuestos, el activo, interaccione con él, la cantidad de complejo fármaco-receptor (Figura 3) puede ser tan mínima que su identificación y aislamiento resulte muy difícil. La nueva Química Combinatoria Dinámica utilizaría reacciones reversibles (Lehn, 2001) (Figura 6) en equilibrio termodinámico. Existe entonces un continuo intercambio de fragmentos estructurales, de modo que los distintos productos de la quimioteca pueden interconvertirse entre sí en permanentes equilibrios. Solo la formación del complejo entre el receptor y el componente activo desplaza ese equilibrio, con el enriquecimiento espontáneo de la mezcla en el componente activo, en forma de complejo, haciendo así mucho más fácil el aislamiento e identificación del mismo (Otto, 2002).

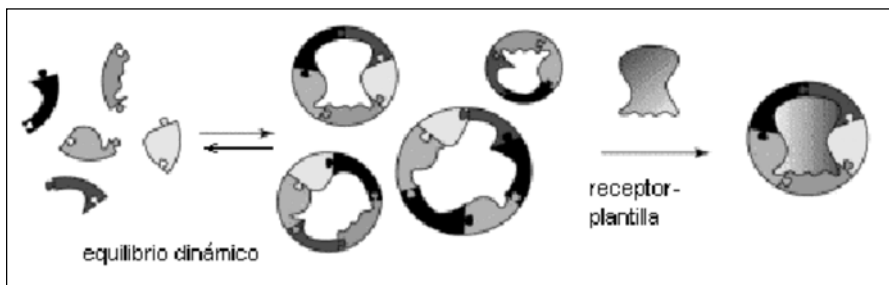


FIGURA 6.

Como reflexión final, podemos ver a la Síntesis Combinatoria como el equivalente sintético de la gran reserva de moléculas que es la Naturaleza. A través de la evolución, la Naturaleza ha producido un gigantesco número y una enorme variedad de estructuras químicas, algunas de las cuales tienen utilidad médica y han sido explotadas por la Química Terapéutica tradicional. Pues bien, la Síntesis Combinatoria está produciendo ahora grandes colecciones, una enorme reserva de nuevas estructuras que no existen en la naturaleza y de las que estamos obteniendo nuevos fármacos. La diversidad de estructuras (algunas beneficiosas, otras tóxicas⁵) en la naturaleza es mucho mayor, pero el aislamiento e identificación de sus principios activos, además de laborioso y lento, no ofrece ninguna garantía de encontrar un cabeza de serie para una determinada diana terapéutica. Por ello, la ventaja de la Síntesis Combinatoria es que produce muy deprisa gran número de compuestos con tipologías estructurales predefinidas y adaptadas a la diana terapéutica que nos interese. Se cumplen así las palabras de E. Blout:

«El objetivo de la Química ha sido, y es, comprender los procesos por los cuales la naturaleza y el hombre pueden construir las complicadas moléculas que permiten que exista la vida, y moléculas capaces de mejorar la calidad de la vida humana».

⁵ No olvidemos el carácter aleatorio de estas propiedades de los productos naturales. No hay razón *a priori* para que un microorganismo que se desarrolló en este planeta hace decenas de millones de años haya generado un metabolito secundario que resulte capaz de curar de una cierta enfermedad a una especie, precisamente la humana, que ni siquiera había aparecido sobre la faz de la Tierra.

BIBLIOGRAFÍA

- ARYA, P.; ROTH, H.J. (2005): «Combinatorial Chemistry». *Curr. Op. Chem. Biol.* 9 (3): 229-231.
- Bayer Scientific Magazine*, Research, (2005), 16ª edición, pag.29.
- BALAY, G. (1999): «A Lottery for Chemists». *Chem. Brit.* March: 25-34.
- BORRELL, J.I.; TEIXIDÓ, J.; FALCÓ, J.L. (1999): *Síntesis Orgánica*, Síntesis. Madrid.
- BURGESS, K. (1999): *Solid Phase Organic Synthesis*, Wiley. New York.
- CAPDEVILLA, E.; BORRELL, J.I.; TEIXIDÓ, J. et al. (2003): «Reacciones dominó y multicomponente». *Afinidad LX*: 506.
- CAWSE, J.N. (2001): «Experimental Strategies for Combinatorial and High-Throughput Materials Development». *Acc. Chem. Res.* 34: 213-221.
- CONGREVE, M.; MURRAY, C.W.; BLUNDELL, T.L. (2005): «Structural biology and drug discovery». *Drug Discov. Today* 10 (13): 895-907.
- ELGUERO, J. (1999): «Discurso de investidura como Doctor Honoris Causa». Universidad de Castilla-La Mancha.
- HOUGHTEN, R.A. (1985): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 5131-5135.
- HOWL, J. (2005): *Peptide Synthesis and Applications*, Humana Press.
- HANGAUER, D. (2001): «Combinatorial Chemistry Enters the College Curriculum», *The Alchemist, The Chem. Web Mag.* [Http://www.chemweb.com/articles/985883680974.html](http://www.chemweb.com/articles/985883680974.html).
- JIMÉNEZ, J.C., GIRALT, E., ALBERICIO, F., (2004): «Péptidos y la Industria Farmacéutica». *An. Quim.* 100(1), 10-16.
- KYRANOS, J. (2004): *High Throughput Analysis for Early Drug Discovery*, Elsevier. Amsterdam.
- LEHN, J.M. (1999): «Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Libraries». *Chem. Eur. J.* 5(9): 2455-2463.
- LEHN, J.M.; ELISEV, A. V. (2001): «Dynamic Combinatorial Chemistry». *Science* 291: 2331-2332.
- MADDEN, D. et al. (1994): *Perspectives in Drug Discovery Design* 2: 269.
- MERRIFIELD, R.B. (1993): «*Life During the Golden Age of Peptide Chemistry*», J. Seeman, Ed., American Chemical Society.
- NICOLI, E.; SOMNY, F. (2005): «Combinatorial chemistry: role, interest and limitations in the discovery of medicine process». *Biofutur* (256): 26-30.
- OTTO, S.; FURLAN, R. et al. (2002): «Dynamic Combinatorial Chemistry». *Drug Discov. Today*, 7: 117-125.
- PATRICK, G.L. (2001): «*An Introduction to Medicinal Chemistry*», Oxford University Press. Oxford.
- SEOANE, C.; SUÁREZ, M.; MARTÍN, N. et al. (2002): «Solid Phase Synthesis of 4-Aryl substituted 5-Carboxy-6-methyl-3,4-dihydropyridones». *Tetrahedron Lett.* 43, 439.
- SRIRAM, D.; YOGEESWARI, P.; NAGAPPA, A.N. (2005): «Combinatorial synthesis of anti-HIV agents - A review». *Comb. Chem. Hght. T. Scr.* 8 (5): 377-385.
- STODDART, J.F.(2002): «Dynamic Combinatorial Chemistry». *Angewandte Chemie* 114, 938
- VERMUTH, C.G., (1996): *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press.
- WALDMANN, H. (1995): «Domino Reactions» en *Organic Synthesis Highlights II*, VCH.

WILSON, S.R.; CZARNIK, A.W. (1997): *Combinatorial Chemistry. Synthesis and Applications*, Wiley. New York.

WEBER, L. et al. (1999): «Discovery of New Multicomponent Reactions with Combinatorial Methods». *Synlett* (3): 366-374.

INTERVENCIONES

Prof. Lorenzo Fernández

Mi felicitación al Prof. Seoane porque éste es un tema de extraordinario interés en cuanto a los avances de la investigación farmacológica, investigación en la consecución de fármacos, y, en definitiva, de fármacos útiles para la terapéutica. Efectivamente, la industria farmacéutica siempre nos dice que se consigue una molécula cada diez mil; esto lleva mucho tiempo y tiene un coste muy elevado. La química combinatoria simplifica enormemente el tiempo y el coste, y al mismo tiempo las dianas terapéuticas tendrán una afinidad mayor del fármaco con el receptor. Esto me parece de una importancia extraordinaria.

Me gustaría hacerle tres preguntas: primera, la industria farmacéutica, los grandes departamentos de química de síntesis, ¿utilizan ya habitualmente la síntesis combinatoria en sus investigaciones?; segunda, esto llevará consigo un abaratamiento del coste de los medicamentos; una de las razones que arguye la industria farmacéutica en el precio elevado de algunos medicamentos es el escaso fruto en relación con el gran esfuerzo que tiene que hacer, esfuerzo económico y esfuerzo de tiempo; tercera, ha citado la optimización estructural, y dentro de ésta me imagino que se tendrán en cuenta los compuestos quirales; hoy día hay una gran tendencia a utilizar compuestos quirales, mayor afinidad por el receptor, mayor precisión en la respuesta, mayor efecto farmacodinámico y menor toxicidad, ventajas de los compuestos quirales que están dentro de la optimización estructural.

Mi felicitación de nuevo, ya que considero este tema de una extraordinaria importancia para médicos, farmacólogos, investigadores y químicos, ya que constituye un avance de gran importancia dentro de la investigación farmacológica.

Prof. Sanz Esponera

Me sumo a la felicitación porque hemos disfrutado mucho. Ahora en oncología se empiezan a conocer dianas terapéuticas y empezamos a saber cuáles son los receptores que han mutado y cómo podemos actuar sobre ellos, y, por tanto, crear o desarrollar fármacos específicos contra ello. Hay ya ejemplos, como en los tumores de estómago gastrointestinal, en los cuales es posible conocer cómo un receptor tirosinquinasa mutado es capaz hoy de interactuar con un producto químico para inhibir esta mutación y, por tanto, evitar la acción de este receptor mutado.

Realmente, yo creo que hoy día la biología molecular nos está abriendo también unos campos inesperados en cuanto al reconocimiento de los procesos reales que están ocurriendo en la transformación, en este caso, de la célula normal en célula tumoral, y nos está permitiendo desarrollar una serie de fármacos específicos. Lo que nos preocupa a veces es el receptor tirosinquinasa que está mutado y en la evolución puede sufrir nuevas mutaciones, y de hecho las sufre. ¿Cómo podemos garantizar que los fármacos que estamos utilizando y que ahora son eficaces pueden, cuando se está produciendo esta evolución o esta mutación sucesiva, ser también eficaces?; es decir, que nos crea una incertidumbre el pensar que estamos abriendo una ventana de esperanza a muchos pacientes que tienen tumores que hasta hace unos años eran intratables y hoy día se empieza a conocer como la alteración, la mutación de estos receptores, fundamentalmente del grupo de la tirosinquinasa, está permitiendo desarrollar estos fármacos. Mi pregunta gira en torno a la importancia que cada día tiene más el conocimiento de los receptores y la significación que puede tener la modificación de estos receptores en el desarrollo de estos fármacos.

Prof. González Barón

Me ha encantado la conferencia del Prof. Seoane, ya que ilustra muchísimo a los que estamos implicados en una medicina muy farmacológica y muy de vanguardia. En la oncología nos interesa mucho este tema, y de hecho, cada vez más, la industria farmacéutica se acerca a los clínicos a preguntar y a recibir una ayuda desde la visión clínica para puro químico en la investigación del desa-

rrollo preclínico inicial. Me ha gustado lo que ha dicho sobre los productos naturales, porque en los últimos tiempos y por personas muy angustiadas por sus enfermedades, vienen a los clínicos a pedirnos casi milagros, derivado de que la prensa está sembrando expectativas falsas. Sin embargo, creo que debe de haber una síntesis entre lo que es la química con la investigación de productos naturales, es decir, en oncología lo hemos tenido, hemos utilizado unos alcaloides y en una etapa posterior hemos utilizado puros productos de síntesis derivados de esos alcaloides.

Prof. Díaz-Rubio García

Me sumo a las felicitaciones de otros compañeros Académicos. Creo que la conferencia del Prof. Seoane demuestra la importancia que tiene tener en esta Academia un sillón específico para un químico. Yo creo que si el Prof. Seoane tenía algún temor de estar entre médicos fundamentalmente, aunque hay otros sillones de especialidades no médicas, o de que no se le entendiera, yo creo que queda claro el interés de su intervención y que es un tema que apasiona a los médicos; al fin y al cabo, el medicamento, el fármaco, es algo que une nuestra acción con el paciente y todos tenemos un alto interés en ver como evoluciona todo este proceso que tan bien ha explicado.

La síntesis combinatoria ya lleva muchos años, la síntesis combinatoria dinámica a la que ha hecho referencia es el futuro y cuando salió a todos nos sorprendió mucho cómo se podían conseguir fármacos en muy poco espacio de tiempo; es decir, frente al desarrollo convencional de un fármaco desde que se comienza a investigar hasta que lo tenemos en la clínica pasan entre 14 y 16 años, con la química combinatoria se pueden obtener fármacos en 4 ó 5 años. Un proceso independiente al que ha explicado el Prof. Seoane es el posterior de validación del fármaco, de ensayar en diferentes fases hasta que se introduce en la clínica, y que es un proceso tedioso, un proceso que no es fácil; posiblemente en un futuro, y gracias también a la química combinatoria, pueda ser sustituido y ganado en tiempo, porque la química combinatoria nos sirve no solamente para los fármacos, sino también para otras áreas.

En relación con el diagnóstico de las enfermedades, ¿hasta dónde puede llegar la química combinatoria teniendo presentes algunos

ejemplos que son tremendamente conocidos como es la nariz artificial que existe, en la cual un conjunto de moléculas se encienden o cambian de color cuando reaccionan con diferentes sustancias químicas y puede ser hasta motivo para detectar determinados artefactos? Eso a uno le hace reflexionar que esto nos puede llevar a tener aplicaciones evidentemente clínicas desde el punto de vista diagnóstico basadas en la clínica combinatoria, y, por supuesto, también en la aceleración importante de lo que supone estos períodos de lo que llamamos en medicina el ensayo clínico, que es un proceso muy largo, que si hemos acertado de 15 a 4 años ha sido gracias a la síntesis combinatoria.

¿Qué prioridad cree o qué sería más fácil de los compuestos que deben ser analizados?, es decir, ha empezado a hablar de los péptidos, que fue lo primero que se hizo, luego en los años 80, a partir del diazepam, se desarrolló una enorme cantidad de derivados del diazepam y ahora creo que se está trabajando mucho en antibióticos, que es un área que puede ser muy importante y que también ha citado. ¿Son realmente estas áreas, o hay otras que se puedan introducir con la química combinatoria dinámica?

Por último, quiero hacer una reflexión muy sucinta de un problema que yo creo que es la consecuencia de la abundancia, es decir, la química combinatoria nos va a permitir tener fármacos, incluso hasta diseños personalizados en un futuro que no tiene por qué ser muy lejano. La química combinatoria nos está mostrando que los nuevos fármacos tienen a veces pequeños beneficios marginales, que lo que nos aporta a lo mejor es simplemente un 0,5 % ó 1 %. En realidad, lo que aporta sobre el fármaco verdaderamente original es poco y sin embargo conlleva un alto coste para el sistema sanitario. ¿Cómo ve el gran coste que puede suponer en un futuro este avance tan tremendo con esta nueva tecnología, de esta nueva síntesis de fármacos que tan fantásticamente nos has expuesto? Yo estoy convencido que esta Academia agradece el tema tan importante que nos has traído.

**META-EFECTO DE LA PROFILAXIS QUIRÚRGICA.
PREVENCIÓN DE LA NEUMONÍA
POST-QUIRÚRGICA PRECOZ**
EARLY-ONSET POST-SURGICAL PNEUMONIA

Por el Ilmo. Sr. D. RAFAEL HERRUZO CABRERA *

Académico Correspondiente

Resumen

Objetivo: Valorar si la profilaxis antimicrobiana quirúrgica, además de su conocido efecto para reducir la infección del sitio quirúrgico, tiene también efecto protector sobre la neumonía postquirúrgica precoz. Para ello se utilizó un estudio de cohorte, con 26.826 enfermos de Cirugía General y de Especialidades del Hospital Universitario La Paz, aplicando modelos multivariantes. Se obtuvieron varios factores de riesgo de esta infección como edad, urgencia, tipo y duración de la cirugía, etc., y un factor de protección, la administración de profilaxis quirúrgica (OR 0,18-0,44), que origina una reducción de 2-5 veces la frecuencia de neumonía postquirúrgica.

Abstract

Objective: to ascertain the impact of surgical antimicrobial prophylaxis on the prevention of early-onset post-surgical (EOPP), using an analytical cohort study covered 26,826 patients at the La Paz University Teaching Hospital (General Surgery and Speciality Surgery). The multivariate model showed several risk factors of early-onset post-surgical pneumonia as age, emergency admission, type of surgery, duration of intervention, etc., and one protection factor, antimicrobial prophylaxis (OR=0.18, General Surgery and OR=0.44, Speciality Surgeries). Then, antimicrobial prophylaxis, aside from its known effect on surgical site infection, was associated as with reduction (2-5 times) of incidence of early-onset postsurgical pneumonia.

* Colaboradores: Jesús Díez Sebastián y Juan García Caballero.

INTRODUCCION

La neumonía nosocomial se define como la infección del parénquima pulmonar adquirida durante la estancia de un paciente en el hospital, y que no estaba presente, ni incubándose, en el momento de ser admitido en el centro. Se trata de un problema común, grave y costoso, que afecta a un porcentaje entre el 0,2 y el 2 % de todos los pacientes hospitalizados (1).

En pacientes postquirúrgicos, la neumonía supone el 18 % de los casos de infección hospitalaria, según el NNIS, aunque esta frecuencia es variable entre el 9 % y el 40 % según el tipo de cirugía, siendo más alta en cirugías de cuello, tórax y abdomen. Por otro lado, su letalidad es muy alta (ejemplo, 30 - 46 % en los pacientes sometidos a cirugía abdominal) (2) y es la causa más común de muerte entre los pacientes quirúrgicos (3).

Todos los autores parecen coincidir en que las microaspiraciones de secreciones faríngeas o gástricas colonizadas son la principal vía patogénica para el desarrollo de las neumonías. La contribución de la intubación para facilitar la diseminación en zonas más bajas del árbol bronquial de estos microorganismos también parece clara, ya sea en el mismo momento de la colocación del tubo endotraqueal, mediante siembra directa, como, posteriormente a la misma, mediante el paso de secreciones colonizadas alrededor del balón de sujeción del mismo (4). Pero la contribución relativa de estas causas puede variar según consideremos la neumonía como precoz (antes de los 4 días de la cirugía) o tardía, y también difieren en la etiología, ya que las neumonías precoces se asocian generalmente a microorganismos similares a los encontrados en las neumonías comunitarias (*S. pneumoniae*, *S. aureus* y *H. influenzae*, que llamaremos grupo I), mientras que las tardías suelen estar provocadas por patógenos nosocomiales más habituales (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, y también *S. aureus*, que llamaremos grupo II) (5, 6).

El uso específico de antimicrobianos intravenosos con intención profiláctica para la neumonía nosocomial es una práctica habitualmente desaconsejada (7). Sin embargo, otros autores encuentran que los antimicrobianos administrados de forma previa a la intubación parecen actuar como factor protector sobre la neumonía precoz asociada a ventilación mecánica, pasando a ser factores de riesgo sobre la neumonía desarrollada más allá de las 48 horas post-intubación (8).

En este mismo sentido, los antimicrobianos administrados pre-

vios a la intubación parecen tener un papel protector (OR: 0,2) para prevenir la colonización por microorganismos denominados del grupo I, y, como consecuencia, un papel protector frente a la incidencia de este tipo de neumonía, cuando ocurre de forma precoz. Por el contrario, este hecho representa un factor de riesgo claro (OR: 6,1) para la colonización posterior (a partir del cuarto día) por microorganismos del llamado grupo II, asociados a la etiología de la neumonía tardía (6).

A la vista de todos estos datos, nos planteamos la pregunta de si la profilaxis antimicrobiana quirúrgica podría actuar a tiempo sobre la flora existente en la orofaringe y vías respiratorias altas, reduciendo la incidencia de la neumonía postquirúrgica precoz (NPP). Aunque su propósito principal, en función del tipo de cirugía y la edad del paciente, es la prevención de la infección de localización quirúrgica, nada impide que su acción pudiera extenderse sobre otros tipos de infecciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población y ámbito de estudio: Se estudiaron los Servicios quirúrgicos (excepto Oftalmología) del Hospital General «La Paz» de Madrid. Cada Servicio se estudia de forma prospectiva en dos periodos trimestrales, alternos, al año. Así, en cada trimestre se incluyen todos los pacientes intervenidos quirúrgicamente, y cuya estancia postquirúrgica sea mayor de 48 horas. Los pacientes se siguen diariamente por personal del Servicio de Medicina Preventiva, recogiendo los datos en una ficha estándar, hasta su alta. Para completar esta información se usa fundamentalmente la historia clínica del paciente, junto con información recogida de los profesionales sanitarios directamente, informes de resultados microbiológicos y el sistema de información del centro. El paciente es seguido hasta su alta hospitalaria (al domicilio, traslado a otro centro o fallecimiento) independientemente de su historia posterior. Si el paciente, por razones de su evolución clínica postquirúrgica es trasladado a otra unidad en nuestro hospital, el seguimiento continúa allí, desplazándose a tal efecto el personal de enfermería para recabar la información pertinente. La muestra de pacientes corresponde a 13 años (1990 al 2002, ambos inclusive) lo que ha supuesto 26.826 enfermos que podemos dividir en las dos cohortes siguientes:

A. Cohorte de «Cirugía General»: 13.024 pacientes

B. Cohorte de «Cirugía de Especialidades». Esta segunda cohorte reúne 13.802 pacientes de los siguientes Servicios: Cirugía Cardíaca, Cirugía Torácica, Cirugía Vasculard, Neurocirugía, Urología, Maxilofacial y Otorrinolaringología.

Diseño del estudio: Observacional longitudinal analítico de cohortes. A partir de estas cohortes se valora la incidencia de infección nosocomial y la de neumonía postquirúrgica precoz (NPP). El estudio de los factores de riesgo asociados al desarrollo de esta infección está diseñado como un estudio de casos y controles anidado en las cohortes, puesto que extrae como sujetos de estudio el grupo de pacientes con NPP (casos) y los controles del subconjunto de pacientes que no han sufrido ningún tipo de infección nosocomial, ya que al existir asociación entre esas infecciones, si eligiésemos los controles entre enfermos con infecciones distintas de NPP, introduciríamos un sesgo.

Variabes de estudio: Los datos recogidos en la ficha de estudio han sido: Datos de filiación: (nombre, edad, sexo, n.º historia clínica, fecha de ingreso, fecha de alta); Datos básicos del ingreso y la cirugía: tipo de ingreso (urgente o programado), fecha de intervención quirúrgica, grado de contaminación de la cirugía, código CIE-9MC de procedimiento, ASA, duración de la intervención quirúrgica, preparación prequirúrgica, datos de la PAQ; Datos de instrumentaciones: sondaje urinario, catéter venoso periférico; Datos de infección: Infección al ingreso (tipo y etiología), e Infección nosocomial (hasta 4 localizaciones por paciente, incluyendo tipo, fecha y etiología); Datos de tratamiento antimicrobiano: tipo de antimicrobiano, dosis, duración. En las fichas de recogida, además de los datos mencionados, se registran la fecha de cada prueba microbiológica, pruebas diagnósticas complementarias, y síntomas o signos clínicos sugerentes de infección. Con toda esta información prospectiva, se diagnosticarán las infecciones nosocomiales que sufra cada enfermo, con los criterios del CDC de 1988 y 1992 (9).

Análisis de los datos: Los datos se analizaron utilizando el programa SPSS v.9. Para el estudio bivalente se utilizó la prueba de la χ^2 o el test exacto de Fisher. En todos los casos de aplicación de la prueba de la χ^2 , se utilizó la corrección de Yates. Las compara-

ciones entre grupos de variables cuantitativas continuas se realizaron mediante pruebas paramétricas, utilizando la *t de Student*, cuando se comparaban dos grupos, o el ANOVA cuando el análisis implicaba tres o más grupos.

Después se realizó un análisis multivariante mediante regresión logística para evaluar el impacto conjunto de potenciales factores de riesgo sobre la incidencia de NPP, controlando a la vez por los factores de confusión (10). En la construcción de los modelos se utilizó un método por pasos hacia delante (*forward stepwise*), incluyendo variables que resultaron significativas en el análisis bivalente o que podrían actuar como variables de confusión. También se exploraron las posibles interacciones entre variables independientes. La evaluación de la significación estadística en cada paso se realizó determinando el -2-log-likelihood . Se calculó el área bajo la curva de cada uno de los modelos para conocer la bondad de ajuste global (11).

RESULTADOS

Los 26.826 pacientes incluidos están divididos en dos cohortes diferenciadas, una de Cirugía General con 13.024 individuos y otra de Cirugía de Especialidades con 13.802. En las tablas I y II se muestran algunos datos descriptivos básicos de ambas cohortes. Como puede verse, la frecuencia de infección nosocomial en general, y de neumonía postquirúrgica precoz, fue mayor en la cohorte de Cirugía de Especialidades (10,4 % y 1,1 %, respectivamente), que en la de Cirugía General (8,6 % y 0,6 %).

Ha existido confirmación microbiológica de la etiología de la NPP en el 66,2 % de los casos en Cirugía General y en el 77,2 % de los de Cirugía de Especialidades. La distribución de etiologías encontrada en los dos grupos se muestra en la Figura 1.

Para el estudio multivariante se utilizó como variable dependiente en ambas cohortes, la presencia de NPP frente al grupo control, los que no sufrieron ninguna infección nosocomial. Ambos modelos de regresión logística solo incluyeron seis variables significativas, y pueden verse en las tablas III y IV. El área bajo la curva fue grande en ambos modelos, así en Cirugía General fue de 0,856 ($IC_{95\%}$: 0,811 – 0,902) y en Cirugía de Especialidades, 0,852 ($IC_{95\%}$: 0,824 – 0,879).

Al observar estas ecuaciones podemos deducir que de todas las NPP que se hubiesen producido por los factores de riesgo de cada

Variables Cuantitativas (m ± ds)	Cohorte de Cirugía General n= 13024	Cohorte de Cirugía de Especialidades n=13802
Edad	53 ± 20,1 años	56,1 ± 18,4 años
Duración cirugía	86,5 ± 62 minutos	132 ± 99,9 minutos
Estancia hospitalaria	14,5 ± 13,7 días	18,1 ± 17 días

TABLA I.

Variables Cualitativas	Cirugía General (n= 13024)	Cirugía de Especialidades (n=13802)
	%	%
Sexo (hombres)	52,8	68,6
Mayores de 65 años	34,9	39,5
Ingreso urgente	34	11,4
Cirugía Sucia	16,5	4,6
Profilaxis quirúrgica:		
-Administrada (adecuada o prolongada)	57	82
- No Administrada no indicada	32,4	11
- No Administrada pero si indicada	10,6	7
Incidencia infección comunitaria	18,1	8,7
Incidencia Infección nosocomial	8,6	10,4
Incidencia neumonía precoz	0,6	1,1
Tratamiento antimicrobiano	74,5	91,3
Mortalidad	4,4	3,9

TABLA II.

Etiología de las NPP en ambas cohortes

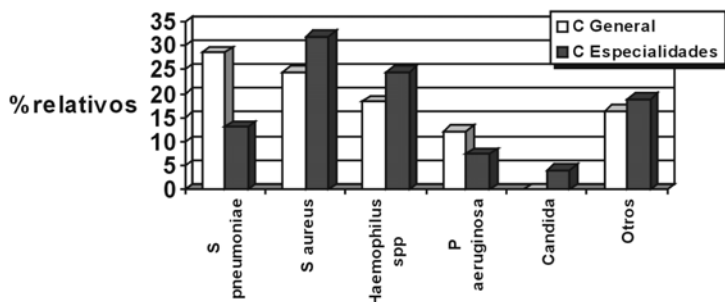


FIGURA 1.

Modelo de RL de NPP. Cirugía General.		Beta	OR Ajustado IC _{95%}
Edad cualificada	> 60 años	0,412	1,51 (1,02 – 2,24)
	≤ 60 años (riesgo basal)		
Ingreso urgente	Sí	0,715	2,04 (1,19 – 3,50)
	No (riesgo basal)		
Tipo de IQ	Cirugía de tiroides, suprarrenales, tejido linfático, año, aparato urinario, aparato reproductor, mama, piel	--	1
	Cirugía de bazo, estómago, I. delgado, apéndice, recto, hígado, vesícula y tracto biliar, páncreas, hernias y eventraciones, I. grueso	1,509	4,52 (0,89 – 23,01)
	Laparotomías, procedimientos diagnósticos abdominales y peritoneo	3,541	34,49 (4,42 – 269,1)
	Cirugía de esófago	5,096	162,78 (16,8 – 1590,1)
Tiempo de IQ	≤ 60 minutos	--	1
	> 60m y ≤ 180 minutos	1,318	3,74 (1,96 – 7,13)
	> 180 minutos	2,316	10,14 (4,56 – 22,50)
Profilaxis antimicrobiana quirúrgica	Administrada adecuada o inadecuada	-1,733	0,18 (0,1-0,3)
	No administrada no indicada	0,806	2,24 (1 – 5,1)
	No administrada sí indicada	--	1
Infección al ingreso	Sí	1,966	7,19 (3,46 – 14,75)
	No (riesgo basal)		
Constante		-8,894	--

TABLA III.

enfermo, al aplicar la protección que supone la quimioprofilaxis quirúrgica (OR<1), se evitaran en Cirugía General 5 de cada 6 NPP y en Cirugía de Especialidades 1 de cada 2. En definitiva, tras controlar los factores de riesgo y de confusión relevantes, concluimos que la profilaxis quirúrgica, además de su conocido efecto para la prevención de la infección de localización quirúrgica, tiene también

Modelo de RL de NNPP. Cirugía de Especialidades		Beta	OR Ajustado IC _{95%}
Sexo	Hombre (riesgo basal)	-0,468	0,63 (0,43 - 0,91)
	Mujer		
Tipo de Servicio Quirúrgico	1.- Urología, ORL, Cirugía Maxilofacial	--	1
	2.- Cirugía Torácica, Cirugía Cardiovascular, Cirugía Vascular	0,873	2,39 (1,41-4,06)
	3.- Neurocirugía	1,494	4,45 (2,77 - 7,17)
Ingreso urgente	Sí	1,529	4,61 (2,99 - 7,11)
	No (riesgo basal)		
Tiempo de Intervención Quirúrgica	≤ 60minutos	--	1
	> 60m y ≤ 180minutos	0,418	1,52 (0,99 - 2,34)
	> 180minutos	1,271	3,56 (2,17 - 5,86)
Profilaxis antimicrobiana quirúrgica	Administrada adecuada o inadecuada	-0,813	0,44 (0,29-0,68)
	No administrada no indicada	-0,111	1,12 (0,58-1,37)
	No administrada sí indicada	--	1
Estancia prequirúrgica	1 día o menos	--	1
	2 a 3 días	-0,384	0,68 (0,46 - 1,01)
	4 o más días	-1,088	0,34 (0,19 - 0,60)
Constante		-5,553	--

TABLA IV.

un importante efecto protector sobre la NPP (máxime en Cirugía General), con lo que se demuestra la hipótesis inicial.

DISCUSIÓN

La incidencia de NPP encontrada en nuestro estudio se mueve en cifras similares a otros estudios nacionales e internacionales, siempre en función del tipo de cirugía (12). La cirugía abdominal

con incisión amplia y la neurocirugía, son los grupos de pacientes con mayor riesgo en cada una de las cohortes estudiadas. En el caso de la cirugía abdominal esto probablemente indica una relación entre la limitación del componente abdominal respiratorio y el reflejo de la tos, el inadecuado control del dolor, la hipoventilación de bases pulmonares, y todos estos factores a su vez contribuyen con la patogenia de la neumonía. Por otro lado, los pacientes neuroquirúrgicos concentran varios de los factores de riesgo de colonización del árbol bronquial y de progresión hacia el desarrollo de una NPP (13), en especial, la transición de colonización a infección, implica generalmente la aspiración de secreciones orofaríngeas o gástricas, frecuentes en el paciente con daño neurológico grave.

El estudio multivariante de factores de riesgo de NPP frente al grupo de pacientes sin infección nosocomial se resume en dos modelos con tan sólo 6 variables independientes respectivamente. Algunas de ellas son comunes para ambos modelos, y la mayoría han sido ampliamente tratadas en otros modelos multivariantes de neumonía en la literatura. Citaremos a continuación estas variables:

La edad es una variable común que encontramos en muchos de los estudios multivariantes publicados que estudian la aparición de neumonía y otras complicaciones pulmonares postquirúrgicas (13, 14). En el modelo de Cirugía General, la edad mayor de 60 años se asocia a un OR de 1,5 de sufrir una NPP, que es algo menor que el encontrado en otros estudios que tienen OR asociados que van desde 1,9 a 2,4. Por otro lado, curiosamente, la edad no siempre queda incorporada como factor independiente, sobre todo en estudios que incluyen la presencia de signos o síntomas clínicos de alteraciones pulmonares previas a la intervención quirúrgica. Hay, al menos, tres ejemplos de trabajos que dejan la edad fuera del modelo, al incluir información sobre, por ejemplo, hábito tabáquico antiguo, antecedentes de EPOC o alteraciones radiológicas preoperatorias, por lo que parece posible que parte de la influencia de la edad ocurra a través de la existencia de enfermedad pulmonar previa (15). De hecho, esto puede ser lo que ocurre en el modelo de Cirugía de Especialidades, donde la edad no queda incluida y en cambio sí lo hace el sexo. La mayoría de la población de este estudio es de edad avanzada (casi un 40 % de mayores de 65 años en esta cohorte), entre los que el hábito de fumar está principalmente arraigado en hombres. Estos dos hechos pueden llevar a pensar que, tal vez, el mayor riesgo del sexo masculino es una expresión de

mayor frecuencia de antecedentes de enfermedad pulmonar y, a través de ella, de mayor frecuencia de NPP.

El tipo de cirugía es, sin duda, el factor asociado con más fuerza a la aparición de una NPP, al igual que en otros trabajos (16). Si dividimos todos los tipos de cirugía en estratos de similar riesgo, en el estrato de menor riesgo, aparece una miscelánea de tipos de intervención quirúrgica asociados a una incidencia baja de NPP (0,1 %); por encima de este grupo tenemos la casi totalidad de cirugía abdominal sobre aparato digestivo, con OR ajustado, respecto el grupo de cirugías anterior, de 4,5. A partir de aquí los dos grupos siguientes suponen un salto importante en incidencia de NPP, por ejemplo, intervenciones quirúrgicas por traumatismos o lesiones penetrantes de abdomen, intervenciones paliativas sobre tumores con diseminación peritoneal, peritonitis diseminadas, etc, procedimientos, en cualquier caso, que implican incisiones extensas y tiempos de intervención prolongados con OR de 34,5. Por último, el grupo de mayor riesgo incluye la cirugía de esófago con una OR de 163. Sin embargo, en Cirugía de Especialidades, este riesgo es menor, 2,5 en intervenciones de tórax y cardiovasculares y 4,5 en neurocirugía. Todo esto puede deberse a la mayor facilidad de aspiración de secreciones orofaríngeas o gástricas como consecuencia del daño neurológico y puede ser el factor clave en este caso. Por otro lado, el papel que puede tener en este tipo de pacientes la existencia de una aspiración prequirúrgica también se señala en otro estudio (13). Existen bastantes datos que corroboran que el paciente neurológico, especialmente si existe coma, tiene mayor riesgo de sufrir neumonía tanto en el paciente crítico como tras cirugía (15).

El ingreso urgente y la duración de la intervención quirúrgica son dos factores bien conocidos en otros modelos publicados de neumonía. Por un lado, el ingreso urgente es, en realidad, un factor muy complejo, que puede agrupar en sí mismo varios factores de riesgo conocidos de la infección hospitalaria, y suele aparecer en modelos de otros autores, ya sea directamente o en forma de puntuación ASA u otras clasificaciones funcionales prequirúrgicas (2, 16).

No resulta nada sorprendente que la duración de la cirugía, relacionada directamente con la duración de la intubación, pueda estar implicada en el riesgo de sufrir una NPP. El papel de la intubación en la patogenia de la neumonía nosocomial forma parte de los factores documentados en la literatura asociados a la neumonía post-

quirúrgica (12). Para cualificar la variable en tres estratos se probaron diversos puntos de corte, y se escogieron aquéllos que separaban mejor los riesgos de NPP (menos de 60 minutos, de 60 a 180 minutos, y más 180 de minutos). Los OR asociados a cada estrato, al controlar por el resto de variables, quedan con valores de aproximadamente 3 y 10 con respecto al basal. En la bibliografía encontramos que la duración de la intervención es una variable asociada con la incidencia de neumonía postquirúrgica, aunque con OR menores (2, 12). Es lógico, en cualquier caso, que el impacto de esta variable sea mayor sobre la incidencia de NPP en nuestro trabajo, que sobre la incidencia de neumonía postquirúrgica global (precoz más tardía) que era el objetivo de la mayoría de la literatura consultada.

La aportación más original de nuestros dos modelos es que el hecho de que la profilaxis antimicrobiana quirúrgica se asocia, como factor independiente a la incidencia de neumonía postquirúrgica precoz en las dos cohortes de pacientes estudiadas. La profilaxis «administrada estando indicada» tiene un OR ajustado de 0,18 y 0,44 respectivamente para cada una de las cohortes, respecto a la situación basal de profilaxis «indicada pero no administrada». Así, la administración de la profilaxis quirúrgica está influyendo, de forma independiente a los demás factores de riesgo o protección, en la incidencia de NPP. Este hecho ya era apuntado por algunos autores, refiriéndose al efecto de pautas cortas de antimicrobianos con intención profiláctica, aunque no asociado a la profilaxis quirúrgica propiamente dicha y en estudios con tamaños pequeños, lo que limitaba su estratificación y extrapolación (5, 13). Sin embargo, nosotros lo hemos podido demostrar en un amplio espectro de cirugías, gracias al gran tamaño de las cohortes. El efecto encontrado es explicable, ya que la profilaxis quirúrgica es capaz de actuar precozmente sobre la flora orofaríngea, antes de la intubación, así como mantener ese efecto durante el tiempo de la misma, eliminando microorganismos que pudieran haber llegado a tramos inferiores de las vías respiratorias como consecuencia de la instrumentación.

Por último, cabe preguntarse si este efecto preventivo sobre la NPP permitiría aventurar la recomendación de extender la profilaxis quirúrgica a todos los pacientes quirúrgicos de cirugía limpia, en la que la incidencia acumulada es de solo 0,1 %. Aunque la profilaxis pudiese tener un efecto preventivo, el NNT sería de 1.100 (número necesario a tratar para evitar un solo caso de neumonía), por lo que

en este caso los costes y efectos adversos podrían contrarrestar los beneficios.

Como conclusión, este trabajo proporciona mayor evidencia a la recomendación de cumplir las pautas de profilaxis antimicrobiana quirúrgica, ya que la administración de la misma, cuando está indicada, además de su efecto conocido sobre la infección de localización quirúrgica, se asocia de forma independiente a una reducción en la incidencia de neumonía postquirúrgica precoz.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) LYNCH, J.P.: «Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology and treatment». *Chest* 2001; 119: 373S-384S.
- 2) BROOKS-BRUNN, J.A.: «Predictors of postoperative pulmonary complications following abdominal surgery». *Chest* 1997; 111: 564-571.
- 3) POLK, H.C. Jr.; HEINSELMANN, M.; MERCER-JONES, M.A., et al. «Pneumonia in the surgical patient». *Curr Probl Surg* 1997; 34: 117-200.
- 4) TORRES, A.; GATELL, J.M.; AZNAR, E., et al.: «Re-intubation increases the risk of nosocomial pneumonia in patients needing mechanical ventilation». *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 137-141.
- 5) KOEMAN, M.; VAN DER VEN, A.J.A.M.; RAMSAY, G.; HOEPELMAN, I.M.; BONTEN, M.J.M.: «Ventilator-associated pneumonia: recent issues on pathogenesis, prevention and diagnosis». *Journal of Hospital Infection* 2001; 49: 155-162.
- 6) IBRAHIM, E.H.; WARD, S.; SHERMAN, G.; KOLLEF, M.H.: «A comparative analysis of patients with early-onset vs late-onset nosocomial pneumonia in the ICU setting». *Chest* 2000; 117: 1434-42.
- 7) HEALTHCARE INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE. «Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003». *MMWR* 2004; 53 : 1-36.
- 8) BORNSTAIN, C.; AZOULAY, E.; DE LASSENCE, A. et al.: «Sedation, sucralfate and antibiotic use are potencial means for protection against early-onset ventilator-associated pneumonia». *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38: 1401-1408.
- 9) HORAN, T.C.; GAYNES, R.P.; MARTONE, W.J.; JARVIS, W.R.; EMORI, T.G.: «CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: A modification of CDC definitions of surgical wound infections». *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13: 606-608.
- 10) KLEINBAUM, D.G.; KUPPER, L.L.; CHAMBLES, L.E.: «Logistic regression analysis of epidemiologic data. Theory and practice». *Commun statist ther math*, 1982; 11: 485-547.
- 11) HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S.: *Applied Logistic Regression*. Nueva York: Wiley, 1989.
- 12) VÁZQUEZ-ARAGÓN, P.; LIZÁN-GARCÍA, M.; CASCALES SÁNCHEZ, P.; VILLAR-CASANOVA, M.T.; GARCÍA-OLMO, D.: «Nosocomial infection and related risk

- factors in a general surgery service: a prospective study». *Journal of Infection* 2003; 46: 17-22.
- 13) BRONCHARD, R.; ALBALADEJO, P.; BREZAC, G. et al.: «Early onset pneumonia: Risk factors and consequences in head trauma patients». *Anesthesiology* 2004; 100: 234-239.
 - 14) AROZULLAH, A.M.; KHURI, S.F.; HENDERSON, W.G.; DALEY, J.: «Preoperative clinical history predicted postoperative pneumonia». *Annals of Internal Medicine* 2002; 137: 819-820.
 - 15) PAWAR, M.; MEHTA, Y.; KHURANA, P. et al.: «Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, outcome and microbiology». *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2003; 17: 22-28.
 - 16) AROZULLAH, A.M.; KHURI, S.F.; HENDERSON, W.G., et al.: «Development and validation of a multifactorial risk index for predicting postoperative pneumonia after major noncardiac surgery». *Ann Intern Med* 2001; 135: 847-57.

INTERVENCIONES

Prof. Rey Calero

Muchas gracias, Prof. Herruzo, porque creo que nos ha demostrado durante muchos años la recogida de 26.000 casos en La Paz, que supone un hito y creo que en muy pocas estadísticas se puede encontrar. Como muy bien sabe el Presidente, hace dos días estábamos en Bruselas y la primera sesión fue nada menos que estudiar esta problemática de la infección asociada a cualquier actuación médica, y naturalmente la actuación quirúrgica es una de ellas, supone para la Unión Europea tres millones de casos, y supone concretamente 50.000 muertos y aproximadamente unos 6,8 millones de euros, y multiplica por tres las estancias hospitalarias, que, en definitiva, es una enorme cuantía no solamente por el daño físico que se le provoca a los pacientes, sino el daño incluso de la mortalidad.

El haber obtenido esas áreas hace de una manera sencilla y fácil hallar unos datos que de otra manera sería un poco duro para los no avezados en estos términos epidemiológicos comprender estos aspectos; por tanto, el haber sacado unos datos tan evidentes manifiesta unos hechos importantísimos. Realmente, en la reunión que acabo de comentar se insistía mucho en que todos los Estados miembros manifiesten cuál es el estado de sus datos, y concretamente creo que ha sido magníficamente expuesto para saber exactamente lo que nosotros hacemos en España. Se habló mucho de la resis-

tencia a los antibióticos; efectivamente, cada vez se fabrican menos antibióticos porque quizás no sean muy rentables al utilizarse para infecciones en países donde no se llegan a cubrir los gastos de la investigación. Estamos encontrando cada vez más problemas en el tratamiento de estas infecciones y estamos desprovistos muchas veces de un arma eficaz y la prueba es estar en esa mortalidad que ha pasado del 7 % al 27 % en algunos casos donde se han dado estas infecciones asociadas.

En definitiva, creo que el nuevo sistema de investigación epidemiológica que se hace en Europa debe recibir estos datos, que son extraordinariamente importantes.

Prof. García-Sancho

Quiero felicitar al Prof. Herruzo por esta magnífica revisión que ha hecho de los enfermos intervenidos en La Paz, de los cuales los cirujanos habremos aportado la mitad y el resto las demás especialidades. Yo he tenido el honor de trabajar con el Prof. Herruzo en la Comisión de Infecciones de La Paz durante muchos años, y esto evidentemente significa un trabajo extraordinario, el ir recogiendo día a día en el Servicio de Epidemiología de Medicina Preventiva, el hacer la vigilancia epidemiológica de todos nuestros pacientes, es un trabajo importante. Por otra parte, es verdad que hemos discutido en muchas ocasiones las génesis de estas neumonías que también los cirujanos hemos aprendido a considerar como infección quirúrgica; bien es cierto que hace 15 ó 20 años los cirujanos sólo considerábamos como infección quirúrgica la infección de la herida o del lugar de la operación, y no se consideraba como infección quirúrgica ni la neumonía, ni la infección del tracto urinario, ni la bacteriemia..., que evidentemente vienen a complicar la evolución de nuestros pacientes.

Yo le querría preguntar al Prof. Herruzo si aparte de todos estos factores que han sido analizados de forma exhaustiva, algún otro tipo de medidas tiene importancia en la génesis de estas neumonías postoperatorias, y en concreto me refiero a la condición de fumador del paciente, al hábito tabáquico del paciente, a la conveniencia o necesidad de que el paciente deje de fumar antes de ser intervenido quirúrgicamente, y a otro tipo de medidas que no son las profilaxis antibióticas en la cirugía, sino la fisioterapia postoperatorio-

ria, porque es verdad que a los pacientes casi siempre se les olvida respirar profundo, respirar con eficacia en el postoperatorio inmediato. Yo creo que estas medidas son muy importantes a la hora de prevenir este tipo de infecciones.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

Dos grandes intervenciones, una del Prof. Seoane sobre síntesis combinatoria, nueva metodología de estudio que se inicia en la química médica. Creo que tiene un interés muy grande y que de esos estudios saldrán importantes decisiones, incluso decisiones clínicas.

En la segunda ponencia, pronunciada por el Prof. Herruzo, acaban de oír un efecto importante de la profilaxis quirúrgica, de la prevención de las neumonías postoperatorias. Afortunadamente, se ha modificado un criterio que había 20 años en donde se quitaba importancia a estas cosas de la prevención quirúrgica, los resultados de la profilaxis quirúrgica, de la profilaxis de las infecciones postoperatorias. Afortunadamente eso ya pasó, porque hubo una época en donde no se hacía especial caso a los resultados de la prevención profiláctica de las infecciones quirúrgicas. Hay que modificar ciertas conductas sobre todo en grandes centros hospitalarios, donde el seguimiento de las infecciones quirúrgicas, bronconeumonías..., ha constituido un problema y antes era una preocupación tremenda. Creo que la microbiología consiste en una metódica esencial que hay que aplicar con todo rigor en nuestros servicios clínicos.

Creo que debemos de aumentar el interés en el estudio microbiológico, en las infecciones hospitalarias. Queda mucho por hacer, hay que hacer un estímulo grande para tratar más eficazmente las infecciones hospitalarias. Los datos que he observado en la comunicación del Dr. Herruzo son importantes. Le felicito porque está haciendo una labor que yo siempre he estimulado.

Se levanta la sesión.

XXI SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 29 DE NOVIEMBRE DE 2005

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

TUMORES DEL ESTROMA GASTROINTESTINAL. GIST

GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR

Por el Excmo. Sr. D. JULIÁN SANZ ESPONERA

Académico de Número

Resumen

Los tumores del estroma gastrointestinal son los tumores mesenquimales más frecuentes en esta localización. El receptor tirosin-Kinasa, C-Kitt, se expresa en prácticamente todos estos ellos. La célula intersticial de Cajal, que regula el movimiento peristáltico del tracto gastrointestinal, se acepta que es de la que derivan estos tumores. De forma mas frecuente se localizan en el estómago (60 a 70%) el intestino delgado (25-35%) y el 5% se originan en el epiplon, mesenterio o retroperitoneo. Aunque determinar el grado de malignidad de estos tumores plantea grandes dificultades, aquellos tumores que tienen mas de 5 mitosis x 10 CGA y un tamaño superior a 5 cms., tienen una mayor incidencia de recidivas intraabdominales y metástasis hepática. Los análisis funcionales de las diferentes mutaciones que se producen en el C.kitt y la importancia que tienen éstas en la respuesta de los inhibidores de la tirosin Kinasa, se están investigando actualmente con gran intensidad.

Abstract

Gastrointestinal stromal tumour is the most common mesenchymal tumour of the human gastrointestinal tract. The c-kit receptor tyrosine Kinase is

expressed by practically all GIST. Interstitial cells of Cajal are the pacemaker of the peristaltic movement of the G.I. tract and these tumors are considered to originate from these cells. A great majority of them occurs in the stomach (60-70%) and small intestine (25% to 35%). Some GIST are primary in the omentum, mesentery or retroperitoneum. Although the prediction of malignancy in this tumour group is notorious by difficult, tumors that have mitotic activity count, exceeding 5 per 50 HPF of those larger than 5 cm have a high frequency of intra-abdominal recurrence and liver metastasis. Functional analysis of the different c-kit mutations and their impact on the response to tyrosine Kinase inhibitor are under intense investigation.

INTRODUCCIÓN

En estos últimos años existe una gran controversia sobre los tumores mesenquimales que se originan en el tracto gastrointestinal, existiendo en la actualidad un gran debate sobre su histogénesis y su línea de diferenciación. Hasta no hace muchos años se creía que la mayor parte de estos tumores tenían su origen en las células musculares lisas de la pared y que por tanto, deberían considerarse de forma semejante a como se hace con tumores similares en otras localizaciones, como en el útero. Sin embargo, era evidente que solo un pequeño número de los mismos recapitulaba la apariencia que tenían en otras localizaciones, pues únicamente los del esófago y el recto, que aparecen como pequeños pólipos leiomiomatosos, tienen una apariencia morfológica similar. El resto presenta tanto cambios citológicos como arquitecturales que no son totalmente característicos de los tumores que derivan de las células musculares lisas. Martín y Colab publicaron en 1960 un grupo de 6 tumores musculares del estómago con una morfología diferente a la de los leiomiomas clásicos, los denominaron tumor bizarro del músculo liso gástrico, estando caracterizados por la presencia de células redondas o epitelioides (1). En 1962 Stout revisa 69 casos de tumores similares y al considerar que derivan de células musculares inmaduras los denomina leiomioblastomas, sin que definiera de forma clara su comportamiento clínico, por lo que se creó una gran confusión sobre el mismo (2). Posteriormente al conocer mejor la biología de estos tumores se consideró que debería de descartarse el término de leiomioblastoma y utilizarse para los benignos el de leiomioma epiteloide, y para los malignos leiomiomasarcoma epiteloide.

La aplicación de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica permite a Mazur y Clark en 1983 (3), dar un cambio

significativo en el nomenclatura e histogénesis de estos tumores. Al observar con técnicas de inmunohistoquímica la ausencia, en la mayor parte de los mismos, de marcadores específicos de músculo liso y la presencia con el Microscopio electrónico de diferenciación neural, ellos proponen que estas lesiones presentan diferentes líneas de diferenciación de acuerdo con las estructuras que constituyen la pared intestinal (como músculo liso o plexos nerviosos) y proponen el término unificador de “tumores estromales” que ha sido modificado al de “tumores del estroma gastrointestinal” para distinguirlos de los tumores estromales en otras localizaciones.

En 1998 Kindblom y colaboradores demuestran que estos tumores tienen un fenotipo similar al que tiene la células intersticial de Cajal, por lo que consideran que se originan de estas células o sus precursoras (4). La células intersticial de Cajal se origina a partir de un precursor de la célula muscular lisa y forma una red ramificada en los plexos de Auerbach que es responsable para la aparición de la actividad de ondas cortas de la musculatura intestinal. Estas células se identifican con técnicas de inmunohistoquímica por la expresión del c-kit que es un receptor de membrana tirosin kinasa. (Fig.1).

Positividad para **CD34**. Expresión de **CD117** (c-kit: receptor de tirosin-quinasa)

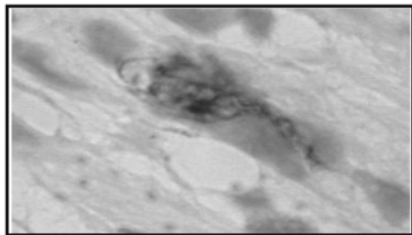
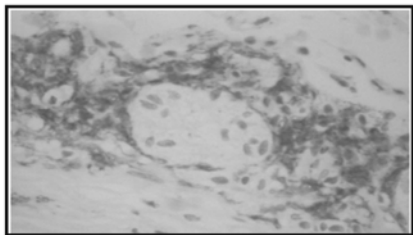


FIGURA 1.

EPIDEMIOLOGÍA Y MORFOLOGÍA

De acuerdo con las series mayores que se han publicado sobre las características clínico-patológicas, la mayor parte de estos tumores se presenta en personas mayores de 40 años, con un incidencia media máxima a los 67 años. La distribución por sexos es similar. Constituyen el 26 % de los tumores del tracto Gastrointestinal y su incidencia anual es de 14.5/1.000.000 de habitantes. Se presentan de

GIST. Incidencia

2% de las neoplasias del tubo digestivo
 Incidencia anual de 14.5/1.000.000
 Adultos. 12 días - 96 años; mediana: 67
 Distribución por sexos es similar.

Esporádicos

Familiares

Asociados a
 otros síndromes



Neurofibromatosis

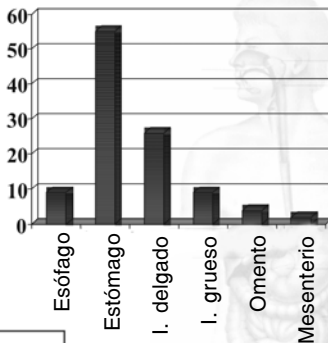
Tríada de Carney



FIGURA 2.

GIST. Localización

- 95 % Gastrointestinales:
- 60% Estómago
- 30% Intestino delgado
- 5% Intestino grueso
- 5% Esófago



107
 casos

- 5 % Extragastrointestinales:
- 80% Epiplon y mesenterio
- 20% Retroperitoneo



FIGURA 3.

forma esporádica pero pueden ser familiares y asociarse a otros síndromes como la neurofibromatosis y la triada de Carney. (Fig. 2)

El 95 % de los tumores se localizan en el tracto gastrointestinal y el 5 % son extragastrointestinales. En nuestra serie de 107 casos, el 60 % se localizaron en el estómago, el 30 % en el intestino delgado, el 5 % en el intestino grueso y el 5 % en el esófago. Las formas extragastrointestinales se localizaron, el 80 % en el eplon y el mesenterio y el 20 % en el retroperitoneo. (Fig. 3)

Su tamaño puede oscilar entre 1 y 32 cm., siendo la media en los casos que hemos estudiado de 4.9 cm. Son generalmente bien delimitados y al corte tienen un aspecto abigarrado, presentando zonas grisáceas con otras amarillentas y focos de necrosis (Fig. 4). La mayor parte de los tumores muestran un crecimiento pseudoexpansivo y un menor número son infiltrantes. Las características histológicas muestran un amplio espectro de patrones celulares que incluyen las formas de células fusiformes, las epitelioides y de forma menos frecuente las pleomórficas (Fig. 5 y 6). Los tumores fusocelulares generalmente son altamente celulares, tienen una apariencia basófila debido a la alta densidad nuclear y relativamente escaso citoplasma. Los núcleos son ligeramente puntiformes, en contraste a la forma roma que presentan los leiomiomas y el citoplasma es finamente fibrilar. La formación de empalizadas nucleares se han observado en el 29,9 % de nuestros casos y de forma frecuente presentan vacuolización perinuclear. En el 48,1 % de los casos el estroma es mixoide, presentando también de forma frecuentes zonas hialinizadas y presencia de fibras eskenoides.

1-32 cm. Media: 4.9 cm. Moda: 3cm. Mediana: 5 cm

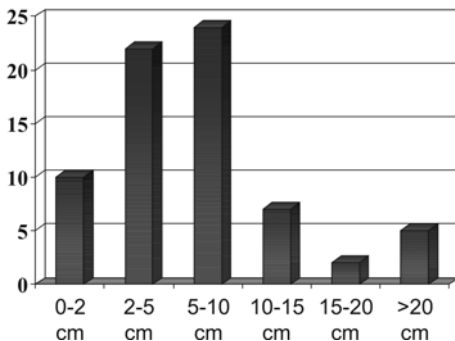


FIGURA 4.

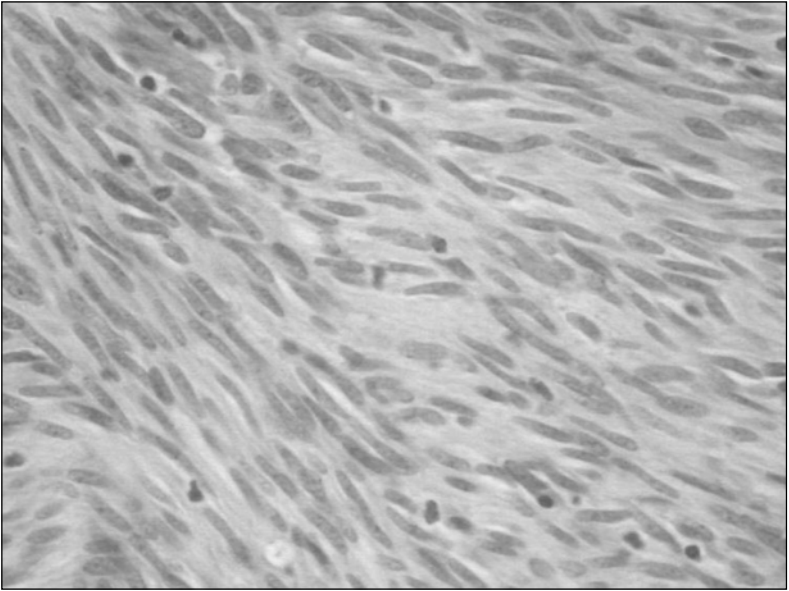


FIGURA 5. Variante fusocelular. Núcleos alargados con borde romo y algunas figuras de mitosis.

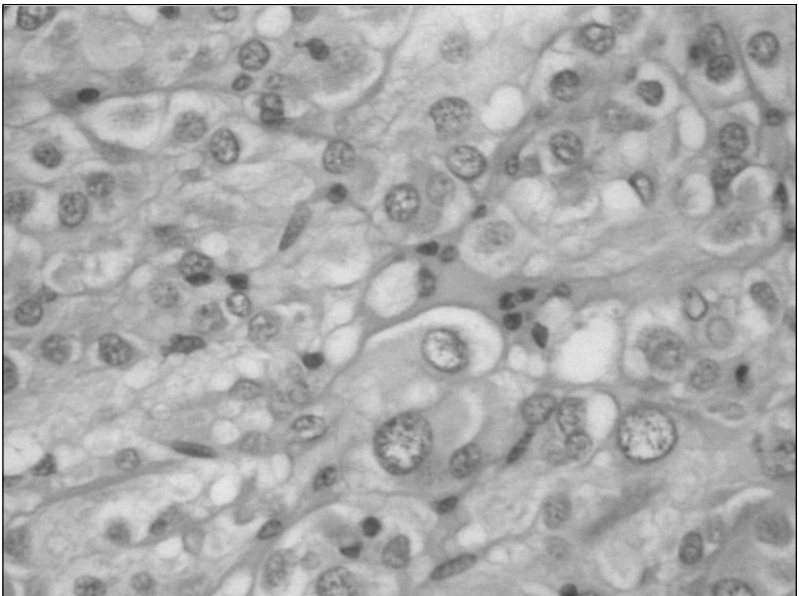


FIGURA 6. Variante epiteloide en la que se observa variación en el tamaño de los núcleos y citoplasma vacuolado.

Las formas epitelioides están formadas por células poligonales con un amplio citoplasma anfófilo y un núcleo redondeado que presenta un grado variable de pleomorfismo, sin embargo, la presencia de hipercromatismo y multinucleación que en principio sugiere malignidad, en este tipo de tumores, es característico de las formas benignas. Otras de las características de estas células es la presencia de una vacuola citoplásmica que en casos extremos le confiere un aspecto de células en anillo de sello, lo que puede confundir el diagnóstico con el de un carcinoma o liposarcoma, como ya señaló Stout en su primitiva descripción. En estas células, la falta de tinción para la grasas o el moco, permite diferenciar fácilmente a estos tumores. De hecho, estas vacuolas citoplásmicas parecen representar un artefacto producido por la fijación en formol, puesto que no se observan en material congelado o el incluido para microscopía electrónica. Las células se disponen formando pequeños grupos o nidos, separados por un estroma colágeno con posibles depósitos de mucina, Menos de un 5 % de los GIST tienen un marcado pleomorfismo nuclear con presencia de células gigantes multinucleadas y grandes nucleolos. Con el microscopio electrónico las células fusiformes presentan en el citoplasma filamentos finos y gruesos, cuerpos densos y vacuolas en la membrana celular (Fig. 7). Las células epitelioides presentan escaso retículo endoplásmico rugoso, escasas mitocondrias y un núcleo grande de forma irregular.

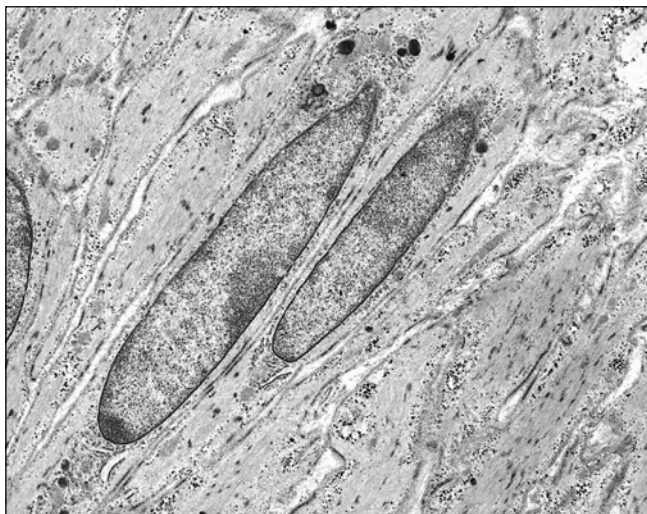


FIGURA 7. Con M.E. las células presentan miofilamentos y cuerpos densos.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Con las técnicas de inmunohistoquímica el 97 % de los GIST de nuestra serie fueron positivos para el C-kit, el 70 % para el CD34, el 58,1 % para la actina y el 100 % para la vimentina. Ocasionalmente las células tumorales fueron positivas para la enolasa neuronal específica, neurofilamentos y la sinaptofisina (Fig. 8).

Anticuerpo	Bibliografía	HCSC
c-kit (CD117)	100 %	97.1 %
CD34	60-70 %	70.0 %
Actina	30-40 %	58.1 %
Proteína S-100	5 %	18.9 %
Desmina	1-2 %	26.1 %
Vimentina	100 %	100.0 %
Nestina	100 %	-
Proteín quinasa C theta	100 %	-
DOG1	98 %	-
CD99	89 %	-
Merlina	84 %	-
F emb cad pesada miosina m lisa	67 %	-
Enolasa neuronal específica	Ocasional	-
Neurofilamentos	Ocasional	-
Sinaptofisina	Ocasional	-
Cromogranina	Ocasional	-
Citoqueratina	Ocasional	-

FIGURA 8.

En 1998 Kitamura y colab. demuestran la expresión del receptor tirosin-quinasa C-kit, el CD117, en prácticamente todos los GIST y la presencia de mutaciones en la mayor parte de los mismos. El CD117 es una proteína de membrana de 145-160 kDa. Codificada por el protooncogen C-kit situado en el cromosoma 4q 11-12 (5). Es un receptor tipo III tirosin-quinasa para el factor de las células Stem. El c-kit es un protooncogen que es el homólogo celular del oncogen c-kit del virus del sarcoma felino y codifica con receptor tirosin-quinasa. Tiene un dominio extracelular constituido por 5 secuencias de Ig like y un dominio tirosin-quinasa que se separa en dos dominios por la inserción de secuencias de longitud variable. La existencia de mutaciones, por ganancia de función, puede ser responsable del origen de estas neoplasias a partir de las células intersticiales de Cajal. El

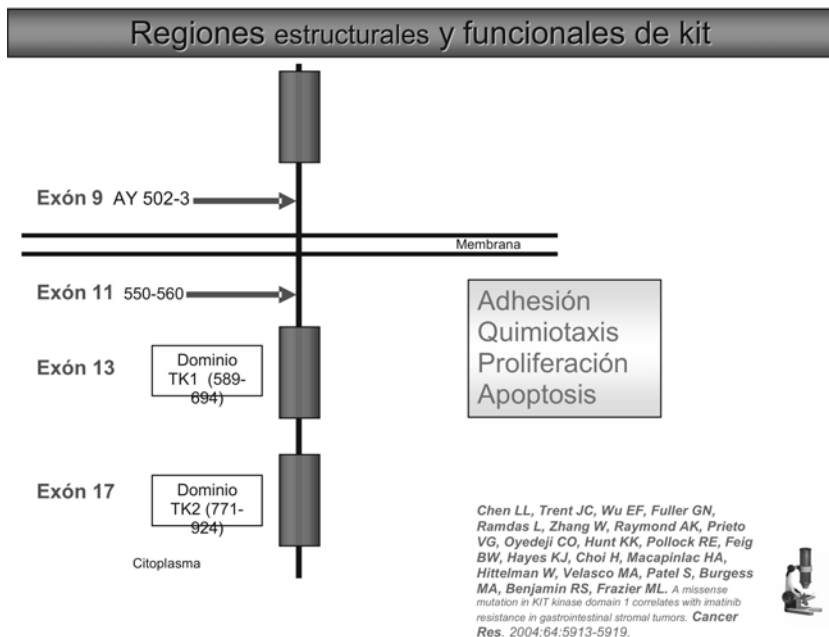
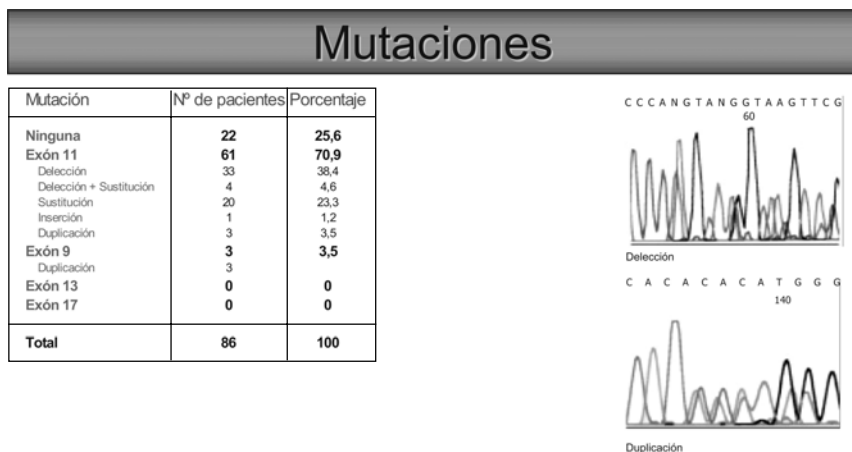


FIGURA 9.



*Kim TW, Lee H, Kang YK, Choe MS, Ryu MH, Chang HM, Kim JS, Yook JH, Kim BS, Lee JS. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. **Clin Cancer Res.** 2004;10:3076-3081.*

FIGURA 10.

70,9 % de las mutaciones fueron detectadas en el EXON II en el dominio tirosin-kinasa próximo a la membrana y consisten de forma mas frecuente en deleciones y duplicaciones. La mutación del C-kit se relaciona con una menor supervivencia de los pacientes con estos tumores, que hoy sabemos, son los que mejor responden al tratamiento con el Glivec por lo que tendremos que revisar las curvas de supervivencia después del tratamiento, puesto que muy posiblemente serán los pacientes con una mayor supervivencia. (Figs. 9 y 10).

DISCUSIÓN

Dada la importancia clínica y terapéutica que tiene actualmente la expresión del C-kit en estos tumores, es evidente, que la mayor parte de los autores, consideran que el término GIST deberá utilizarse únicamente para aquellas neoplasias que presentan inmunopositividad para el CD117, con muy pocas excepciones. Teniendo además en cuenta que no todos los GIST expresan el C-kit, debido a defectos de fijación, a errores en la toma, y en un porcentaje muy pequeño, menos del 2 %, porque falta la mutación o sobreexpresión de este protooncogen. El hecho de que estos tumores tienen unas características clínico-patológicas tan definidos, hace dudar a algunos autores, si es imprescindible la confirmación con técnicas de inmunohistoquímica, de la positividad con el CD-117, para hacer su diagnóstico. Sin embargo, nosotros, al igual que otros autores, consideramos que es necesario hacer en todos los casos esta técnica de inmunohistoquímica para confirmar el diagnóstico por las implicaciones terapéuticas que lleva consigo. Pero al igual que cualquiera de las técnicas de inmunohistoquímica que utilizamos, sus resultados deben de valorarse también, con los hallazgos morfológicos (7).

Los criterios para distinguir las formas benignas de las malignas, en este tipo de tumores, han sido discutidos en este últimos años. Se ha propuesto la valoración de muchos parámetros, considerándose dentro de los morfológicos, el número de mitosis y el tamaño del tumor, como los que mejor permiten definir la malignidad de estos tumores. Amin y colaboradores en 1993 (8) consideraban que los benignos tenían menos de 5/50 C.G.A. y un tamaño menor a 5 cm. Los Boderline tienen el mismo número de mitosis, pero un tamaño mayor de 5 cm. y los malignos tiene de 5/50 CGA y cual-

quier tamaño. Miettinen y colaboradores en el 2002 (9) relacionan el número de mitosis y el tamaño con la localización, de forma que consideraban que en el estómago los benignos tienen un tamaño menor a 5 cm. y menos de 5/50 CGA, en el intestino, tienen menos de 2 cm. e igual número de mitosis. Los malignos en el estómago son los que tienen un tamaño mayor a 10 cm. y más de 5/50 CGA y en el intestino los que tienen un diámetro mayor de 5 cm. y el mismo número de mitosis. Los de pronóstico incierto son aquellos que en el estómago tienen un diámetro mayor a 5 cm. pero menor de 10 cm con un número de mitosis inferior a 5/50 CGA, en el intestino los que tienen un diámetro mayor a 2 cm. y menos de 5 cm., con un número igual de mitosis. Fletcher y colaboradores (7) han propuesto en el 2002 los siguientes criterios de malignidad. Son tumores de muy bajo riesgo los que tienen un diámetro menor a 2 cm. y menos de 5/50 CGA, de bajo riesgo cuando su tamaño está entre 2 y 5 cm. y tienen el mismo número de mitosis. De riesgo intermedio aquellos que tienen un tamaño menor a 5 cm. y tienen 6-10/50 CGA o tienen un diámetro de 5-10 cm y menos de 5/50 CGA. De alto riesgo son los que tienen un tamaño mayor a 5 cm. y más de 5/50 CGA, más de 10 cm. con cualquier índice de mitosis y los de cualquier tamaño que tiene más de 10/50 CGA (Fig.11). Junto a estos parámetros morfológicos actualmente tiene gran importancia la presencia o no de mutaciones en el del C-kit, teniendo una me-

GIST. Criterios de malignidad

	Tamaño	Índice mitótico
Muy bajo riesgo	< 2cm	<5 / 50 CGA
Bajo riesgo	2- 5 cm	<5 / 50 CGA
Riesgo intermedio	< 5 cm	6-10 / 50 CGA
	5-10 cm	<5 / 50 CGA
Alto Riesgo	>5 cm	>5 / 50 CGA
	>10 cm	Cualq. índice
	Cualq. Tamaño	>10 / 50 CGA

Fletcher et al. *Hum Pathol* 2002. 33:459-465



FIGURA 11.

nor supervivencia los que presentan la mutación que los que no la presentan. Sin embargo, como ya he señalado, actualmente sabemos que tienen una mejor respuesta al tratamiento los que presentan una mutación en el Exon II del c-kit.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MARTÍN, S.F.; BARIN, P.; FEROLDI, S. and CABANNE, F.: «Tumeurs myoïdes intramurales de l'estomac, considerations microscopiques á propos de 6 cas». *Ann. Anat. Path* 5:484-497,1960.
- (2) STOUT, A.P.: «Bizarre smooth muscle tumors of the stomach». *Cancer* 15: 400-469, 1962.
- (3) MAZUR, M.T.; CLARK, H.B.: «Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis». *Am J Surg Pathol*. 1983; 7:507-519.
- (4) KINDBLOM, L.G.; REMOTTI, H.E.; ALDENBORG, F.; MEIS-KINDBLOM, J.M.: «Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal». *Am J Pathol*. 1998; 152:1259-1269.
- (5) KAWANO, K.; HANADA, M.; KURATA, A.; TAKEDA, M.; MUHAMMAD TUNIO, G.; MATSUZAWA, Y.; KANAKURA, Y.; SHINOMURA, Y.; KITAMURA, Y.: «Gain of function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors». *Science*. 1998; 279: 577-580.
- (6) KOON, N.; SCHENIDER-STOCK, R.; SARLOMA-RIKALA, M.; LASOTA, J.; SMOLKIN, M.; PETRONI, G.; ZAIKA, A.; BOLTZE, C.; MEYER, F.; ANDERSSON, L.; KNUUTILA, S.; MIETTINEN, M.; EL-RIFAI, W.: «Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours». *Gut*. 2004; 53: 235-240.
- (7) FLETCHER, C.D.; BERMAN, J.J.; CORLESS, C.; GORSTEIN, F.; LASOTA, J.; LIONGLEY, B.J.; MIETTINEN, M.; O'LEARY, T.J.; REMOTTI, H.; RUBIN, B.P.; SHMOOKER, B.; SOBIN, L.H.; WEISS, S.W.: «Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach». *Hum Pathol*. 2002; 33: 459-465.
- (8) AMIN, M.B.; MA, C.K.; LINDEN, M.D.; KUBUS, J.J.; ZARBO, R.J.: «Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome». *Am J Clin Pathol*. 1993;100: 428-432.
- (9) MIETTINEN, M.; EL-RIFAI, W.; H. L. SOBIN, L.; LASOTA, J.: «Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review». *Hum Pathol* 2202; 33: 478-483.

SUMARIOS DEL TOMO CXXII

CUADERNO PRIMERO

Páginas

SOLEMNE SESIÓN INAUGURAL PARA LA APERTURA DEL CURSO ACADÉMICO DÍA 11 DE ENERO DE 2005

Memoria de Secretaría 2004, por el Excmo. Sr. D. Juan Jiménez Collado	4
Discurso inaugural, por el Prof. Félix Pérez Pérez	18
Homenaje a la antigüedad académica al Prof. D. Manuel Armijo Valenzuela	24
Imposición de Medalla de Honor al Excmo. Sr. D. José María Ramírez Pomatta	25
Entrega de la placa en agradecimiento al Oficial Mayor, D. Félix Martín Franco	26

I SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 18 DE ENERO DE 2005

«La Asamblea Amistosa Literaria (Jorge Juan, Cádiz, 1755): Academia Científica española con alto contenido médico, por el Prof. Francisco González de Posada	27
Intervenciones:	
Del Prof. Sánchez Granjel	42
Del Prof. Domínguez Carmona	42
Del Prof. Campos Muñoz	43

II SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 25 DE ENERO DE 2005

«Reemplazamiento valvular aórtico con autotrasplante de válvula pulmonar (Procedimiento de Ross), por el Ilmo. Sr. D. Manuel Concha Ruiz	45
Intervenciones:	
Del Prof. Tamames Escobar	57
Del Prof. Rey Calero	58

SESIÓN NECROLÓGICA EN MEMORIA DEL EXCMO. SR. D. DOMINGO ESPINÓS PÉREZ. DÍA 1 DE FEBRERO DE 2005

Discurso de Precepto, por el Excmo. Sr. D. Manuel Díaz-Rubio García	63
Intervenciones:	
Del Prof. Durán Sacristán	76
Del Prof. Reol Tejada	79
Del Prof. Tormo Alfonso	81
Del Prof. Moya Pueyo	82
Del Prof. Rey Calero	84
Del Prof. Poch Broto	86
Del Prof. Sánchez García	86
Del Prof. Rodríguez Rodríguez	88
Del Prof. Domínguez Carmona	91
Del Prof. Portugal Álvarez	91
Del Prof. Segovia de Arana	92
Del Prof. Robledo Aguilar	93
Del Prof. Tamames Escobar	94
Del Prof. Escudero Fernández	95
Del Prof. Lucas Tomás	96
Del Prof. García-Conde	96
Del Prof. Jiménez Collado	97
Del Prof. Sanz Esponera	98
Del Prof. Reinoso	99

III SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 8 DE FEBRERO DE 2005

«Discretas locuras. Variaciones en torno al tema de la locura de Don Quijote», por el Excmo. Sr. D. Diego Gracia Guillén	105
Intervenciones:	
Del Prof. Alonso Fernández	121
Del Prof. Rey Calero	125
Del Prof. Campos Muñoz	126
Del Prof. Rubia Vila	127
Del Prof. Poch Broto	128
«Lectura médica de <i>El Quijote</i> », por el Excmo. Sr. D. Luis Sánchez Granjel	131
Intervención del Prof. Alonso Fernández	143

IV SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 22 DE FEBRERO DE 2005

«El problema social del embarazo de adolescentes», por el Excmo. Sr. D. Juan del Rey Calero	149
Intervenciones:	
Del Prof. Escudero Fernández	166
Del Prof. Vidart Aragón	167
Del Prof. Clavero Nuñez	167
Del Prof. Sánchez García	168
«Una reflexión sobre el futuro de las vacunas», por el Excmo. Sr. D. Ángel Nogales Espert	171
Intervenciones:	
Del Prof. Escudero Fernández	184
Del Prof. Portugal Álvarez	184
Del Prof. Suárez Fernández	185

V SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 1 DE MARZO DE 2005

«Aplicaciones de la patología molecular en el estudio de los tumores cerebrales», por el Excmo. Sr. D. Julián Sanz Esponera	191
«La función alterada de los desmosomas epidérmicos y su repercusión clínica (pénfigos)», por el Excmo. Sr. D. Alfredo Robledo Aguilar	197
Intervenciones:	
Del Prof. Pérez Pérez	206
Del Prof. Campos Muñoz	206
Del Prof. Poch Broto	208
Del Prof. Casado de Frías	208
Del Prof. Jiménez Collado	210

CUADERNO SEGUNDO

Páginas

VI SAESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 8 DE MARZO DE 2005

«Historia natural de la Influenza Aviar o “Gripe del pollo”. Análisis sanitario actual y prospectivo, por el Excmo. Sr. D. Guillermo Suárez Fernández	215
Intervenciones:	
Del Prof. Domínguez Carmona	228
Del Prof. Rey Calero	229
Del Prof. Mayor Zaragoza	230
Contestaciones del Prof. Suárez Fernández	230

VII SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 15 DE MARZO DE 2005

«La materia y la energía oscuras del Universo», por el Excmo. Sr. D. José Aguilar Peris	233
Intervención del Prof. Domínguez Carmona	246
Contestación del Prof. Aguilar	247

SESIÓN NECROLÓGICA EN MEMORIA DEL EXCMO. SR. D. LUIS CIFUENTES DELATTE. DÍA 5 DE ABRIL DE 2005

Discurso de Precepto, por el Excmo. Sr. D. Diego Gracia Guillén	251
Intervenciones:	
Del Prof. Sánchez García	263
Del Prof. Cruz Hermida	265
Del Prof. Díaz-Rubio	266
Del Prof. Durán Sacristán	268

VIII SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 12 DE ABRIL DE 2005

«Conocimientos, saber, sabiduría. El viejo y el maestro», por el Ilmo. Sr. D. José de Portugal Álvarez	273
Intervenciones:	
Del Prof. Sánchez García	283
Del Prof. Antonio Campos	284
Del Prof. Sánchez Granjel	285
Del Prof. Rodríguez Rodríguez	286
Del Prof. Poch Broto	286

IX SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 19 DE ABRIL DE 2005

«La contaminación ambiental y los niños», por el Excmo. Sr. D. Enrique Casado de Frías	291
Intervenciones:	
Del Prof. Pérez Pérez	305
Del Prof. Portera Sánchez	307
Del Prof. Sánchez García	308
Del Prof. Seoane Prado	308
Del Prof. Rodríguez Rodríguez	310
Del Prof. Escudero Fernández	310
Del Prof. Domínguez Carmona	311
Del Prof. Nogales Espert	311
«El adipocito, célula prodigiosa», por el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona	313
Intervenciones:	
Del Prof. Pérez Pérez	333
Del Prof. Sanz Esponera	334
Del Prof. Rodríguez Rodríguez	335
Contestación del Prof. Domínguez Carmona	335

X SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 26 DE ABRIL DE 2005

«Efecto del glutamato monosódico por vía oral sobre el control del apetito (una nueva teoría para la epidemia de la obesidad)», por el Excmo. Sr. D. Jesús A. Fernández-Tresguerres Hernández	341
Intervenciones:	
Del Prof. Blázquez Fernández	355
Del Prof. Fernández de Molina	356
Del Prof. Clavero Núñez	357
Del Prof. Portera Sánchez	357
Del Prof. Sánchez García	357
Del Prof. Nogales Espert	358
Del Prof. Casado de Frías	358
Contestaciones del Prof. Fernández-Tresguerres	359
«La idea es más importante que el experimento», por el Dr. John Martin	361
Intervenciones:	
Del Prof. Rey Calero	370
Del Prof. Sánchez García	372
Del Prof. Sánchez Granjel	372

XI SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 10 DE MAYO DE 2005

«Herpesvirus humano 6 y esclerosis múltiple», por el Excmo. Sr. D. Gonzalo Piédrola Angulo	377
Intervenciones:	
Del Prof. Pérezagua Clamagirand	389
Del Prof. Domínguez Carmona	389
Del Prof. Suárez Fernández	390
Del Prof. Portugal Álvarez	390
Del Prof. Díaz-Rubio García	390
Contestación del Prof. Piédrola Angulo	391
«Nuevos diagnósticos basados en los avances de la Biología molecular», por la Excma. Sra. D.ª M.ª del Carmen Maroto Vela	393
Intervenciones:	
Del Prof. Suárez Fernández	401
Del Prof. Blázquez Fernández	402
Del Prof. Portugal Álvarez	403
Del Prof. Domínguez Carmona	403
Del Prof. Casado de Frías	403
Contestaciones de la Prof. Maroto Vela	405

XII SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 17 DE MAYO DE 2005

«Instituto de terapéutica operatoria (1880-1939). Instituto Rubio y Gali, Instituto Moncola. Contribución a las especialidades médicas y enfermería en España, por el Ilmo. Sr. D. Francisco Vázquez de Quevedo	411
Intervenciones:	
Del Prof. Gracia Guillén	426
Del Prof. Pérezagua Clamagirand	427
Del Prof. Escudero Fernández	427
Del Prof. González de Posada	427
Del Prof. Sánchez Granjel	428
Del Prof. Tamames Escobar	428
Del Prof. Díaz-Rubio	429

XIII SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 24 DE MAYO DE 2005

«Interés terapéutico de las curas balnearias», por el Excmo. Sr. D. Manuel Armijo Valenzuela. .	433
Intervenciones:	
Del Prof. Moya Pueyo	444
Del Prof. Sánchez Granjel	446
Del Prof. Durán Sacristán	447
Del Prof. Pérezagua Clamagirand	448
De la Prof. ^a San Martín Bacaicoa	448
Contestación del Prof. Armijo Valenzuela	449
«¿Crea el cerebro la realidad?», por el Excmo. Sr. D. Francisco José Rubia Vila	451
Intervenciones:	
Del Prof. González de Posada	459
Del Prof. Suárez Fernández	461
Del Prof. Fernández de Molina	461
Del Prof. Poch Broto	462
Contestación del Prof. Rubia Vila	462

XIV SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 7 DE JUNIO DE 2005

«Cirugía cerebrovascular. Dilemas», por el Excmo. Sr. D. Máximo Poza Poza	467
Intervención del Prof. Jiménez Collado	487
«El viaje de <i>legionella pneumophila</i> desde la ameba hasta el macrófago. Reflexiones sobre la mayor epidemia de la enfermedad del legionario», por el Ilmo. Sr. D. Manuel Segovia Hernández	489
Intervenciones:	
Del Prof. Domínguez Carmona	498
Del Prof. Rey Calero	499
Del Prof. Campos Muñoz	501

SESIÓN NECROLÓGICA.—DÍA 14 DE JUNIO DE 2005

Discurso de precepto, por el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza	506
Intervenciones:	
Del Prof. Sánchez García	514
Del Prof. Escudero Fernández	516
Del Prof. Pérez Pérez	517
Del Prof. Domínguez Carmona	519
Del Prof. Reinoso Suárez	519
Del Prof. Durán Sacristán	520
Del Prof. Reol Tejada	521
Del Prof. Armijo Valenzuela	522
Del Prof. Tena Núñez	523

XV SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 11 DE OCTUBRE DE 2005

«Algunos aspectos a considerar de la Medicina en los albores del siglo XXI», por el Excmo. Sr. D. Amador Schüller Pérez	529
Intervenciones:	
Del Prof. Rey Calero	540
Del Prof. Sánchez García	541
Del Prof. Lucas Tomás	541
Del Prof. Moya Pueyo	542
Del Prof. Díaz-Rubio	543
Del Prof. Jiménez-Collado	544
«Consecuencias clínicas de la función alterada de los desmosomas epidérmicos en el hombre», por el Excmo. Sr. D. Alfredo Robledo Aguilar	547
Intervenciones:	
Del Prof. Casado de Frías	566
Del Prof. Lucas Tomás	568
Del Prof. Poch Broto	568

XVI SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 18 DE OCTUBRE DE 2005

«Fisiología humana» (Presentación del libro), por el Excmo. Sr. D. Jesús A. Fernández-Tresguerres Fernández	571
Intervenciones:	
Del Prof. Fernández de Molina	575
Del Prof. Valtueña	576
Contestación del Prof. Tresguerres	576
«Astenia tumoral», por el Ilmo. Sr. D. Manuel González Barón	577
Intervenciones:	
De la Prof. ^a Sanmartín	588
Del Prof. Casado de Frías	588

XVII SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 25 DE OCTUBRE DE 2005

«Asociación del dolor físico y la depresión», por el Excmo. Sr. D. Francisco Alonso Fernández	595
Intervenciones:	
Del Prof. López Timoneda	612
Del Prof. Blázquez Fernández	613
Del Prof. Rodríguez Rodríguez	614
Del Prof. Lucas Tomás	614
Del Prof. Sánchez García	615
Del Prof. Díaz-Rubio	616
Contestación del Prof. Alonso Fernández	616
«Córnea artificial. Cultivos celulares e ingeniería tisular», por el Excmo. Sr. D. Antonio Campos Muñoz	619
Intervenciones:	
Del Prof. Munuera Martínez	626
Del Prof. Rodríguez Rodríguez	626
Del Prof. González Barón	627

XVIII SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 8 DE NOVIEMBRE DE 2005

«Comprender la muerte celular: un reto para la biomedicina», por el Excmo. Sr. D. José Vilches Troya	631
Intervenciones:	
Del Prof. Campos Muñoz	656
Del Prof. González Barón	657
De la Prof. ^a Maroto Vela	658
Del Piédrola Angulo	658
«El hombre y el mar: fitoplancton marino y salud pública», por el Ilmo. Sr. D. José Mira Gutiérrez	661
Intervenciones:	
Del Prof. Rey Calero	679
Del Prof. Pérez Pérez	680
Del Prof. Domínguez Carmona	681
Contestación del Prof. Mira Gutiérrez	681

XIX SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 15 DE NOVIEMBRE DE 2005

«Fusión renal en período embrionario», por el Excmo. Sr. D. Juan Jiménez Collado	685
Intervenciones:	
Del Prof. Carreras Delgado	695
Del Prof. Segovia Arana	695
Del Prof. Perezagua Clamagirand	696
«Mis bodas de plata con la Academia. Un pretexto para recordar a los viejos amigos desaparecidos», por el Ilmo. Sr. D. Julio Cruz y Hermida	697
Intervenciones:	
Del Prof. Lucas Tomás	714
Del Prof. Martínez Fornés	715
Del Prof. Sierra García	715
Del Prof. Jiménez Collado	716
Contestación del Prof. Cruz y Hermida	718

XX SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 22 DE NOVIEMBRE DE 2005

«Síntesis combinatoria: una nueva metodología en química médica», por el Excmo. Sr. D. Carlos Seoane Prado	724
Intervenciones:	
Del Prof. Lorenzo Fernández	737
Del Prof. Sanz Esponera	738
Del Prof. González Barón	738
Del Prof. Díaz-Rubio García	739
«Meta-efecto de la profilaxis quirúrgica. Prevención de la neumonía post-quirúrgica precoz», por el Ilmo. Sr. D. Rafael Herruzo Cabrera	741
Intervenciones:	
Del Prof. Rey Calero	753
Del Prof. García-Sancho	754

XXI SESIÓN CIENTÍFICA.—DÍA 29 DE NOVIEMBRE DE 2005

«Tumores del estroma gastrointestinal. GIST», por el Excmo. Sr. D. Julián Sanz Esponera	757
---	-----