

ANALES DE LA REAL ACADEMIA DE DOCTORES



Volumen 4 • Número 1

Marzo 2000

Domicilio Corporativo: San Bernardo, 49 • 28015 Madrid

ANALES DE LA REAL ACADEMIA DE DOCTORES

Publicado por la Real Academia de Doctores

Director

Gustavo Villapalos Salas
Presidente de la Real Academia de Doctores

Editora

María Cascales Angosto
Tesorera de la Real Academia de Doctores

Consejo de redacción

Guillermo Suárez Fernández
Secretario General

Salvador Muñoz Iglesias
Sección Teología

Antonio López Gómez
Sección Filosofía y Letras y Ciencias de la Información

Julian Manuel Fernández del Corral
Sección Derecho

Alberto Portera Sánchez
Sección Medicina

Angel Vian Ortuño
Sección Ciencias

Angel Santos Ruiz
Sección Farmacia

Manuel López Cachero
Sección Ciencias Políticas, Económicas y Empresariales

Antonio del Valle Menéndez
Sección Ingeniería

Luis Antonio Fernández-Galiano Ruiz
Sección Arquitectura y Bellas Artes

Laureano Sáiz Moreno
Sección Veterinaria

Portada:

Niveles de peróxidos en hepatocitos de rata tratados con ciclosporina A, 5 μ M, analizados por microscopía confocal. Imagen obtenida al incubar las células con yoduro de propidio y diacetato de diclorohidrofluoresceína, Andrés et al., p. 199 de este volumen.

Diseño:

M. Cascales
A. García

Coordinación, corrección de textos:

M. Cascales y A. García

Depósito legal: M. 11.690-1997

ISSN: 1138-2414

Imprime: REALIGRAF, S.A.

Pedro Tezano, 26
28039 Madrid

INDICE

Págs.

Humanidades:

- Persona y apertura en Xavier Zubiri. *Blanca Castilla y Cortázar* 7
- Poesía: «Diez años de académico». *Luis Vázquez Fernández* 25
- «El poeta Dámaso nos ofrece...». *Luis Vázquez Fernández* 27

Ciencias Jurídicas y Sociales:

- El agua bien económico. *José González Paz* 35
- Pasado, presente y futuro de la economía del bienestar. *José González Paz* 51
- El justicia de Aragón en Joaquín Costa. *Jesús López Medel* 75
- El hecho educativo en una sociedad multicultural. *Jesús López Medel* 83

Ciencias de la vida y de la salud:

- Tiempo y espacio en Bioquímica y Medicina. *Mario Sapag Hagar* 99
- De nuevo la historia de la Listeria (*L. Monocytógenes*). *Guillermo Suárez Fernández* 115
- Los factores ecológicos en la infección y contagio. *Guillermo Suárez Fernández* 127
- Citotoxicidad de la cocaína: especies reactivas de oxígeno y apoptosis. *Asunción Zaragoza, Carmen Díez-Fernández, David Andrés, Alberto Álvarez-Barrientos y María Cascales Angosto* 137
- Toxicidad de la ciclosporina a en el cultivo primario de hepatocitos de rata. Influencia de la etapa del desarrollo. *David Andrés, Nuria Sanz, Carmen Díez-Fernández, Asunción Zaragoza, Alberto Álvarez-Barrientos y María Cascales Angosto* 171

	<u>Págs.</u>
— Avances en el estudio del cáncer de colon y recto. <i>Jesús Martínez-Falero.</i>	227
— Micotoxinas y su efecto supresor sobre aves. <i>M. A. Calvo Torras y M. Agut Bonsfills</i>	241
— Las aguas minerales de Galicia. <i>Antonio Ramírez Ortega, M. Esperanza Rial Lemos y Javier-Ángel Ramírez Masferrer</i>	249
 Ciencias experimentales y tecnológicas:	
— Efecto de la eliminación progresiva en individuos atípicos en la regresión por etapas. <i>Francisco Javier Diaz-Llanos y Carmen Cermeño Carrasco.</i>	267
 Normas para presentación de originales	 299

PERSONA Y APERTURA EN XAVIER ZUBIRI¹

BLANCA CASTILLA Y CORTÁZAR

Los estudios antropológicos me han llevado a preguntarme acerca de la persona humana como apertura, en concreto como *apertura al otro* o, dicho con otras palabras, si la apertura al otro, que de algún modo es evidente, forma parte de la estructura personal.

Para avanzar en dicha investigación es preciso preguntarse qué se entiende por persona y qué se entiende por apertura.

Pues bien, con estas preguntas planteadas me interesé en la filosofía de X. Zubiri, que se había ocupado de ambas cuestiones.

Por una parte en muchas de sus reflexiones toca el tema de la apertura: así, al hablar de la respectividad o de la religación, al considerar a la persona como esencia abierta o en sus relaciones con los demás, y no digamos al tratar todo el tema de lo transcendental.

Por otra parte para Zubiri tenía un valor especial el tema de la persona. En efecto, en 1959 dictó un curso oral titulado *Sobre la persona*². Era tal la importancia que en su pensamiento tenía el configurar bien qué es el hombre como realidad personal que, como es sabido, aquel curso le condujo a escribir el libro *Sobre la esencia*³, que nació como una nota a pie de página a un tratado de antropología⁴.

Al profundizar en sus escritos me he preguntado qué relaciones hay entre apertura y libertad o, dicho con otras palabras, de qué manera la libertad posibilita la apertura y en caso de que esa apertura sea transcendental, y, por tanto, esté en cierto modo antes de sus actos, qué relación hay entre persona y libertad.

Por otro lado, para Zubiri entre los seres del universo sólo al hombre le corresponde de un modo adecuado el concepto de sustantividad. Ahora bien, si el hombre está

¹ Se recoge aquí la comunicación presentada por la autora al primer Congreso Internacional Xavier Zubiri, celebrado en Madrid en julio de 1993, bajo el título: «*Relevancia de la noción de "persona" en el pensamiento de Xavier Zubiri*». El texto no ha perdido actualidad. Por aquel entonces la autora estaba escribiendo un estudio más amplio sobre este tema que fraguó en el libro: *La noción de persona en Xavier Zubiri. Una aproximación al género*, el Rialp, Madrid 1996. La perspectiva de este trabajo es original y no está recogida en dicha publicación.

con otros y los otros en cierto modo forman parte de sí, esa sustantividad no está aislada sino articulada con las demás. Teniendo en cuenta la amplitud de la temática, que abarca casi la obra entera de X. Zubiri, me ceñiré solamente a algunos aspectos concretos.

I. LA APERTURA DE LA SUSTANTIVIDAD HUMANA

«Por donde quiera que se mire, se descubre el tema de la persona como uno de los problemas capitales del pensamiento actual» afirmaba Zubiri el 16 de abril de 1959⁵. El tema le siguió preocupando a lo largo de su vida. Así escribía en 1984, veinticinco años después:

«entre otras limitaciones la metafísica griega tiene una fundamental y gravísima: la ausencia completa del concepto y del vocablo mismo de *persona*. Ha hecho falta —dice— el esfuerzo titánico de los capadocios para despojar al término de hipóstasis de su carácter de puro *hypokeímenon*, de su carácter de *subjectum* y de sustancia, para acercarlo a lo que el sentido jurídico de los romanos había dado al término *persona*, a diferencia de la *pura res*, de la cosa»⁶.

Precisamente a ese empeño, de despojar el término de sujeto de su carácter de *subjectum* y de sustancia, dedicó Zubiri mucho trabajo, creando para ello el término de sustantividad que acoge sin dificultad la característica de estar *hyper-keímenon*, superestante a sus propiedades, ya que es propio de algunos sujetos determinar por decisión algunas, aunque no todas, de las propiedades que van a tener. Por tanto no están 'por debajo de' de esas propiedades, sino justamente al revés 'por encima de' ellas. No son *hypo-keímenon*, substantes, sino *hyper-keímenon*, superestantes, por así decir. «En el hombre —afirma— estos dos momentos de substancia y super-stancia se articulan de modo preciso en su sustantividad»⁷.

Para determinar en qué consiste la sustantividad humana Zubiri compara al hombre, realidad personal, con los animales, que son las realidades cósmicas más cercanas. La diferencia que encuentra entre ellos es que «el animal tiene asegurada en sus propias estructuras la 'conexión' entre los estímulos y las respuestas. Por ello, aunque la vida del animal sea muy rica, esta vida está siempre constitutivamente 'enclasadada'»⁸.

² Después de haberlo impartido como conferencias comenzó a redactarlo como libro. De ese propósito nació el artículo *El hombre como realidad personal*, publicado en 1963: Cfr. ZUBIRI, X., *Siete ensayos de Antropología Filosófica*, ed. Univ. de Santo Tomás, Bogotá 1982, pp. 55-77. Posteriormente, buena parte del curso que había quedado sin terminar de escribir, se recogió en dos capítulos del libro *Sobre el hombre*. En concreto el cap. IV: *La persona como forma de realidad: personéidad*, y la primera parte del cap. V: *La personalidad humana y su constitución*, en ZUBIRI, X., *Sobre el hombre*, Alianza editorial, Madrid 1986, pp. 103-152.

³ ZUBIRI, X., *Sobre la esencia*, Alianza editorial, Madrid 1985 (primera ed. 1962) 574 pp.

⁴ Cfr. Introducción al libro *Sobre el hombre*, o.c., de Ignacio Ellacuría, p. XX.

⁵ Cfr. ZUBIRI, X., *Siete ensayos de Antropología ...*, o.c., p. 55

⁶ ZUBIRI, X., *El hombre y Dios*, Alianza editorial, Madrid 1984, p. 323.

⁷ Cfr. ZUBIRI, X., *El hombre realidad personal* en *Siete ensayos de...*, o.c., p. 70.

⁸ Cfr. ZUBIRI, X., *El hombre realidad personal* en *Siete ensayos de...*, o.c., p. 66.

Sin embargo el hombre se distingue radicalmente del animal en que «el elenco de respuestas que unos mismos estímulos podrían provocar queda prácticamente indeterminado. Las propias estructuras somáticas (...) no garantizan la respuesta adecuada»⁹. Es decir el hombre como puro animal no es viable. Y he aquí el primer rasgo de la apertura humana. La apertura de sus respuestas a los estímulos, que no están determinadas por sus estructuras. La apertura humana está exigida biológicamente. La vida humana no está enclausurada. El hombre es 'esencia abierta'.

Esta apertura humana está posibilitada por la inteligencia, que consiste fundamentalmente en «hacerse cargo de la situación»¹⁰, que es lo mismo que decir que «el hombre aprehende las cosas como realidades»¹¹; en esto consiste formalmente la inteligencia.

De ahí que «la primera función de la inteligencia es estrictamente biológica: hacerse cargo de la situación para excogitar una respuesta adecuada (...) La vida del hombre es una vida constitutivamente abierta»¹².

En este sentido inteligencia y libertad se unen casi hasta no poder distinguirse. Ese hacerse cargo de la situación y dejar abierto el camino de la respuesta es justamente la libertad. En palabras de Zubiri «la determinación de un acto por razón de la realidad querida, es justamente lo que llamamos libertad (...) la sustantividad humana opera libremente en el mundo»¹³.

Ahora bien, aunque es precisamente en el nivel operativo donde se descubre la apertura del hombre, esta apertura operativa se debe a unas características estructurales o entitativas del hombre mismo. En este sentido afirma Zubiri que ser «persona no es un carácter primariamente operativo sino constitutivo»¹⁴. Por eso como más adelante veremos hay un aspecto de la inteligencia y también de la libertad que se consideran entitativos, estructurales o constitutivos.

II. QUÉ ES SER PERSONA

Para examinar en qué consiste radicalmente la realidad personal, Zubiri reconoce que no es suficiente el análisis de los actos humanos como diferentes a los actos animales. «Por mucho que se acentúe la diferencia entre los diversos tipos de actos humanos —afirma—, es imposible mediante este solo análisis salir a flote en el problema de la persona»¹⁵. La razón principal que le lleva a sostener esto es porque ser «persona no está en poder ejecutar actos intelectivos o de voluntad, sino en que la inteligencia, la voluntad y la libertad sean 'más'»¹⁶.

⁹ *Ibídem* p. 66

¹⁰ *Ibídem*, p. 67

¹¹ *Ibídem*, p. 67

¹² *Ibídem* p. 67

¹³ *Ibídem*, p. 69.

¹⁴ *Ibídem*, p. 77.

¹⁵ ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad: personéidad*, en *Sobre el hombre*, Alianza editorial, Madrid 1986, p. 106.

¹⁶ *Ibídem*

Otra posible vía para analizar en qué consiste ser persona sería el distinguir entre persona y naturaleza, es decir entre el posidente y lo poseído. Esta apreciación que de un modo global es verdadera, porque hay una diferencia entre el yo y sus facultades, se difumina al tratar de precisar en qué consiste esa diferencia. En efecto el yo, considerado como sujeto al estilo de como lo hacía Descartes, pasa a ser *algo vacío*, o bien tiene que tener alguna estructura intrínseca: en este caso se vuelven a introducir en el yo todas las facultades y desaparece la diferencia entre persona y naturaleza. Por ello afirma Zubiri «la concepción de la persona como sujeto nos hace perder la persona, sea desvaneciéndola, sea convirtiéndola en pura naturaleza»¹⁷. En conclusión, «la persona no se descubre ni en los actos ni en el sujeto»¹⁸.

La diferencia entre las personas es intrínseca y cualitativa. La distinción entre yo-tú-él no es una mera distinción numérica, porque en tal relación las personas son insubstituíbles. En efecto «cada persona encierra en sí el carácter de un *mí*. *Ser persona es ser efectivamente mí. Ser una propiedad sustantiva que es propiedad de sí misma*»¹⁹.

Por tanto la primera y principal característica de la persona, según Zubiri, es ser «realidad **EN PROPIEDAD**. La diferencia radical que separa a la realidad humana de cualquiera otra forma de realidad es justamente *el carácter de propiedad*»²⁰. Y lo peculiar de esta propiedad es que «se trata de una propiedad en sentido constitutivo»²¹. Porque soy una propiedad mía y en la medida en que lo soy tengo capacidad de decidir²². Ser propiedad significa que me pertenezco de un modo plenario. El pertenecerme, el ser en propiedad es algo constitutivo de mi realidad²³, de tal manera que el momento de ser 'perteneciente a' forma uno de los caracteres esenciales y formales de mi realidad en cuanto tal. Y por eso soy persona. Ser persona es «ser propiedad mía»²⁴.

La realidad personal consiste en ser una realidad en propiedad constitutiva, físicamente constituida y, además, reduplicativamente, por cuanto el ser propio pertenece formalmente a aquello que tengo en propiedad²⁵.

¹⁷ *Ibídem*, p. 109

¹⁸ *Ibídem*

¹⁹ *Ibídem*, p. 111.

²⁰ *Ibídem*.

²¹ *Ibídem*

²² Es decir no se trata de una propiedad de carácter moral, es decir, de tener dominio, de ser dueño de los propios actos en el sentido de tener derecho, libertad y plenitud moral para hacer efectivamente de uno y de sus actos lo que se quiera dentro de las posibilidades que se poseen. Se trata de una propiedad ontológica no simplemente moral o jurídica. Eso son consecuencias. «Yo soy mi propia realidad, sea o no dueño de ella. Y precisamente por serlo, y en la medida en que lo soy, tengo capacidad de decidir. La recíproca sin embargo, es falsa», afirma Zubiri. (*Ibídem*, p. 111)

²³ Por ello distingue Zubiri este tipo de pertenencia de las llamadas propiedades de una cosa. Se llaman justamente propiedades porque le pertenecen, son de ella. Pero una cosa es que sea 'propias-de' y otra que pertenezcan a la realidad formal de la cosa que las posee. Cfr. *Ibídem* p. 111.

²⁴ *Ibídem*, p. 112

²⁵ El poseerse a sí mismo no significa 'ser para sí' a diferencia de 'ser en sí'. No se trata de 'ser para sí', sino de los caracteres reales y efectivo que tiene una persona, en virtud de lo cual en alguno de sus actos es 'para sí'. Pero sus caracteres constitutivos están allende el 'ser para sí' y como raíz del 'ser para sí'. Cfr. *Ibídem*, p. 112.

Esa característica de ser propiedad de sí está unida en cierto modo a la inteligencia. Zubiri lo dijo ya en el año 59: «La inteligencia es la estructura radical que el hombre posee, en virtud de la cual se enfrenta con el resto de la realidad y hasta con su propia realidad»²⁶. Esto lo volvió a afirmar más explícitamente en su libro *Sobre la esencia*: «La inteligencia, que es una nota esencial, tiene una función trascendental exclusiva de ella. (...) Es una diferencia trascendental y no sólo talitativ»²⁷.

En este sentido se puede decir que inteligencia y persona, en cierto modo, son lo mismo, pues la persona es autoposición de sí gracias a la inteligencia, que está a nivel trascendental. La inteligencia es un elemento formal (en el sentido zubiriano de la expresión) de la subsistencia²⁸, como propiedad trascendental de la realidad.

Por eso Zubiri no comparte la definición de persona dada por Boecio: «substancia individual de naturaleza racional»²⁹, donde la inteligencia no tiene un papel constitutivo sino simplemente de diferencia específica³⁰. Para Zubiri, como venimos diciendo, la inteligencia no es especificación del subsistente sino constitución personal del mismo. Está, por tanto, no sólo a nivel talitativo sino también a nivel trascendental. Por esta razón no puede haber una realidad intelectual que no sea personal³¹.

III. EL 'DE SUYO' Y LA 'SUIDAD'

A 'ser en propiedad' es a lo que Zubiri ha llamado «suidad». En efecto, para Zubiri la esencia de las cosas consta de dos momentos: el talitativo que consiste en el conjunto de notas en sistema cíclico clausurado, que le confiere suficiencia constitucional, y la función trascendental que afecta a la realidad en cuanto realidad. Este segundo momento estructural de la esencia hace que cada cosa sea 'de suyo'.

Pues bien, hay esencias, y esas son las humanas, en que la función trascendental no se agota en ser 'de suyo', sino que están abiertas a su propia realidad. Son esencias abiertas:

«Estas esencias no son 'en sí' y 'nada más', sino que en su manera misma de ser en sí son abiertas a su carácter de realidad *qua* realidad, y por tanto

²⁶ ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre* o.c., pp. 117-118. La cita continúa: «Por ella (la inteligencia) el hombre es una realidad dividida de todo lo demás, indivisa en sí misma y perteneciente en propiedad a sí misma (...). Precisamente porque la inteligencia al inteligir puede serlo todo se encuentra separada y distante, de todo lo demás. El hombre al inteligir una cosa, cointelige forzosamente su propia realidad en una o en otra forma: cointelige su propia realidad».

²⁷ ZUBIRI, X., *Sobre la esencia*, p. 501

²⁸ Como es sabido más tarde dejó de emplear el término subsistencia, pero el significado no cambia. Desde esta terminología afirma que «la persona no consiste en ser sujeto sino en ser subsistente». Cfr. ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 122.

²⁹ BOECIO, *Liber de persona et duabus naturis contra Eutychem et Nestorium*, en J. MIGNE, *Patrologiae. Cursus completus*, Paris, Vrayet de Surey, 1847, PL 64, 1343

³⁰ Cfr. ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., pp. 118-119. Algo similar ocurre en la definición de Ricardo de San Victor.

³¹ Cfr. ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 121

son abiertas, en principio, a todo lo real en cuanto real. Son las esencias inteligentes y volentes»³².

Esta apertura consiste en que aunque

«toda esencia se pertenece a sí misma, al ser abierta se comporta en el orden operativo no sólo por sus propiedades talitativas (...) sino que se comporta respecto de su propio carácter de realidad. Esto significa que (...) se pertenece a sí misma de un modo peculiar»³³.

Esto es, dicho con otras palabras, aquello en lo que consiste el 'Ser en propiedad' del que hablaba antes.

Para Zubiri todas las cosas reales son reales porque son 'de suyo'. Y entre ellas la realidad humana además de ser 'de suyo' es una realidad 'suya'. Tiene una característica peculiar: una más plena realización de la autoposesión, que en cierto modo se da en todas las cosas.

«La esencia estrictamente abierta es suya 'formal y reduplicativamente'; no sólo se *pertenece* a sí misma, sino que tiene ese modo peculiar de pertenecerse que es *poseerse* en su propio y formal carácter de realidad, en su propio 'ser suyo'. Es una realidad en cuanto tal lo que es 'suya'. (...) Tomado el *poseerse* como un carácter del acto primero, este modo de ser suyo es justo lo que constituye la persona»³⁴.

La persona es denominada por Zubiri como 'suidad'. Y la '*suidad*' la define diciendo que es «tener una estructura de clausura y de totalidad junto con una plena posesión de sí mismo en sentido de pertenecerse en el orden de la realidad»³⁵.

En otro lugar afirma: «El hombre es una realidad no hecha de una vez por todas, sino una realidad que tiene que ir realizándose en un sentido muy preciso. Es, en efecto, una realidad constituida no sólo por sus notas propias (en esto coincide con cualquier otra realidad), sino también por un peculiar carácter de su realidad. Es que el hombre no sólo tiene realidad, sino que es una realidad formalmente 'suya', en tanto que realidad. Su carácter de realidad es '**suidad**'. Es lo que a mi modo de ver constituye el carácter formal de la persona»³⁶.

IV. PERSONEIDAD Y PERSONALIDAD

Ser en propiedad, como se ha visto, es algo constitutivo. Pero además se puede considerar una consecuencia de ese orden entitativo en el orden operativo. Entonces estamos en el ámbito de la personalidad.

³² ZUBIRI, X., *Sobre la esencia*, Alianza editorial, Madrid 1985. p. 500

³³ ZUBIRI, X., *Sobre la esencia*, p. 503

³⁴ ZUBIRI, X., *Sobre la esencia*, p. 504

³⁵ ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 117.

³⁶ ZUBIRI, X., *El problema teológico del hombre*, en *El hombre y Dios*, pp. 372-373

En efecto, Zubiri distingue en la persona dos planos. Uno constitutivo y a este le llama *personidad*. La *personidad* constituye el punto de partida para el desarrollo de la persona mediante sus actos, que constituiría el nivel de la personalidad. La personalidad se va configurando a lo largo de la vida. Constituye no el punto de partida, sino el término progresivo del desarrollo vital.

Sin embargo la persona, tomada como *personidad* es cosa distinta. Es algo de lo que se parte. Dicho con sus palabras: «el oligofrénico es persona; el concebido, antes de nacer es persona, Son tan personas como cualquiera de nosotros. En este sentido la palabra persona significa (...) un carácter de sus estructuras, y como tal es un punto de partida. Porque sería imposible que tuviera personalidad quien no fuera ya estructuralmente persona. Y sin embargo no deja de ser persona porque ésta haya dejado de tener tales o cuales vicisitudes y haya tenido otras distintas. A este carácter estructural de la persona lo denominó *personidad* a diferencia de la *personalidad*»³⁷

La persona trasciende sus actos y tiene frente a ellos una triple función:

- a) Tiene unas *dotes* gracias a las cuales es el *agente* natural de sus actos: anda, come, ve, piensa, siente, quiere.
- b) Hay otra dimensión por la cual el hombre es *autor* de sus actos; no de todos, por lo menos en el sentido de libres, pero es autor en sentido eminente cuando opta por unos actos o por otros, por una o por otra manera de ser.
- c) El hombre además se encuentra inexorablemente inscrito en una trama de la realidad de la que no es dueño, por lo que no es ni agente ni autor, es *actor* de una vida. Se encuentra ante unas determinadas circunstancias históricas, sociales, incluso internas, en virtud de las cuales decimos que le ha tocado un cierto papel en la vida³⁸.

Los actos emergen de la persona unitariamente en esa triple dimensión. Pues bien la *personidad* aunque no es principio de operación en sentido de ser agente, pues para ser agente no es necesario ser persona, si lo es en cuanto autor y como actor.

Por otra parte los actos vitales no son algo indiferente. «Personalidad no es sin más un conjunto de actos, sino la cualidad que esos actos imprimen a la realidad que es su ejecutor»³⁹. La actividad libre de cada hombre forja en cierto modo su persona.

Los actos no pueden menos que calificar a quien los produce. «Y es que el hombre no solo ejecuta unos actos, sino que en una o en otra forma se los *apropia*»⁴⁰. La personalidad tiene ciertos caracteres: una cierta estabilidad y una continuidad. Y junto a esas características tenemos el hecho de que esta personalidad está calificando intrínseca y formalmente al que la posee, confiriéndole no sólo una biografía sino también una *forma mentis*, que forma su figura.

³⁷ ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 113.

³⁸ Cfr. ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., pp. 125-126.

³⁹ ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 113.

⁴⁰ ZUBIRI, X., *La persona como forma de realidad*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 127

En este sentido se puede hablar de otro modo de apertura que tiene la persona: está abierta a su propia realización.

V. PERSONA Y LIBERTAD

Otra de las características peculiares del ser humano que le diferencia del resto de las cosas del universo es la libertad. Pues bien, la persona se identifica con la libertad en uno de los sentidos que Zubiri da a la libertad.

La libertad, efectivamente, puede tener distintos aspectos. Zubiri recoge tres: 'libertad de', libertad para' y 'libertad en':

«La libertad es en un primer sentido **'libertad de'**. El hombre puede ser libre, se siente libre en la medida en que está libre de determinadas coacciones, de determinados impulsos, del peso de una tradición que no es reflexiva sino recibida rutinariamente, etc. Liberarse de esto en una o en otra medida es lo propio de un aspecto de la libertad, que es la 'libertad de'»⁴¹.

Hay otro aspecto de la libertad:

«El hombre está libre de todo esto, tiene libertad en el sentido de liberación ¿para qué? Justamente para ser sí mismo. Es la **'libertad para'**. El hombre no solamente está liberado de las cosas, sino que es inexorablemente 'libre para'. Libre para ser justamente una forma de realidad frente a toda otra libertad»⁴²

Pero, además, hay un tercer aspecto último y radical de la libertad, porque, al fin y al cabo, la libertad 'de' y la libertad 'para' afectan más bien a los modos de ejercitar la libertad:

«Hay una cosa previa que es ser libre, anteriormente a todo ejercicio de libertad. Es justamente **'libertad en'**. El hombre es libre 'en' la realidad en cuanto tal. Por ser justamente de aquella condición en virtud de la cual yo soy mío, me pertenezco a mí mismo y no a otra realidad»⁴³.

Comentando estos aspectos de la libertad, y en busca del último aspecto, que es el constitutivo, Zubiri afirma: «Esa es la cuestión: si, dentro del orbe del ser, soy efectivamente libre, cualquiera que sea el alcance metafísico de la distinción entre ser y ente»⁴⁴.

Entre estos aspectos de la libertad hay una gradación desde la operatividad al núcleo entitativo o estructural: «Pero sobre todo, como el *de* y el *para* no son sino dos modos de ser, nos encontramos con una libertad *en* aquello que es el hombre mismo,

⁴¹ ZUBIRI, X., *El hombre y Dios*, Alianza editorial, Madrid 1984, p. 323.

⁴² ZUBIRI, X., *El hombre y Dios*, pp. 329-330

⁴³ ZUBIRI, X., *El hombre y Dios*, pp. 330

⁴⁴ ZUBIRI, X., *Sobre el sentimiento y la volición*, ed. Alianza editorial, Madrid 1992, p.

y por lo que el hombre ejecuta real y efectivamente su acto libre. No solamente es libertad de y libertad para, sino libertad-de-la-ejecución-de un acto»⁴⁵.

Pues bien, este tercer sentido de la libertad viene a ser lo mismo que la persona: «La libertad en este sentido es o puede ser idéntica a la persona. No lo es en los dos primeros, pero sí lo es radical y eminentemente en este tercero. Es *ser libre*»⁴⁶. Con esta declaración tenemos que tanto persona, como inteligencia, como libertad son elementos constitutivos de la realidad humana y, por tanto, están a nivel trascendental. Aunque se distinguen nominalmente porque en el plano operativo tienen diverso sentido el inteligir o el querer, hay un plano donde son difícilmente distinguibles porque forman una unidad que una de ellas hace posible a la otra. Libertad, inteligencia, persona son diversos nombres que designan la estructura ontológica y constitutiva, trascendental del ser humano.

VI. PERSONA Y APERTURA A LOS DEMÁS

Ahora habría que analizar la primera cuestión que suscitó nuestra búsqueda: el modo como la persona está abierta a los demás y, en concreto, si dicha apertura es parte constitutiva del ser personal.

En primer lugar Zubiri afirma que los demás hombres con su condición de auto-definición y autoposición «intervienen constitutivamente en mi vida»⁴⁷. Esto responde en parte a nuestra pregunta aunque de momento no se diga el cómo y el por qué.

Zubiri parte, como es su estilo, de una descripción lo más detalladamente posible de los hechos que se presentan a nuestra aprehensión: «por el mero hecho de hacer cada cual la vida con los demás hombres nos encontramos, en primer lugar, con que mi situación, que ellos me crean es, por lo menos, una *co-situación*. Una *co-situación* que, en términos generales podemos llamar de simple *convivencia*»⁴⁸.

Por esa co-situación de convivencia los demás hombres me afectan en una dimensión más radical que las cosas. Zubiri dice de entrada que «la vida de los demás forma parte formal de mi vida. De suerte que en mí mismo en cierto modo están ya los demás»⁴⁹.

Ahora bien «por mucho que se afirme esta verdad —sigue diciendo—, sin embargo es claro que yo no soy los demás. Mi vida es la mía, y no es la de los demás; mi autoposición es la mía y en manera alguna la autoposición de los demás. Esta singular

⁴⁵ ZUBIRI, X., *Sobre el sentimiento y la volición*, ed. Alianza editorial, Madrid 1992, p. 92. La cita comienza así: «En todo el problema de la 'libertad-para' nos encontramos en una situación inversa a la que nos encontrábamos con la 'libertad-de'. La *libertad-para* a última hora revierte sobre la *libertad-de*. La cual libertad de no es necesariamente libertad de otro orden, sino que puede ser y es, simplemente, libertad de otro modo de ser. Con lo que nos encontramos, primero, con la *libertad de*; segundo con una *libertad para*».

⁴⁶ ZUBIRI, X., *El hombre y Dios*, pp. 330

⁴⁷ ZUBIRI, X., *El hombre, realidad social*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 223.

⁴⁸ *Ibíd.*

⁴⁹ *Ibíd.*, p. 224

condición de que, por un lado, los demás estén implicados en mí, y de que, por otro lado, yo no sea los demás, plantea dos cuestiones completamente distintas (...) qué son los otros; y en segundo lugar en qué forma los otros afectan a mi vida y la modifican»⁵⁰.

En este trabajo nos centraremos especialmente en la que era el tema de nuestro interés: ¿Cómo afectan los otros mi vida y la modifican? Zubiri analiza este asunto buscando el fundamento de lo que él llama *la versión a los demás* y al describir la estructura de la convivencia. Este hecho lo caifica con el término *vinculación*⁵¹.

1. La versión a los demás

En primer lugar constata el hecho de que, antes de que se tenga vivencia de ello, los demás han intervenido en mi vida y están interviniendo en ella: el niño se encuentra con que los demás se han metido en su vida. En primer lugar para trasmitirle la vida misma, para conservársela mientras él no podía hacer nada, etc.

Por tanto la primera característica de este estar uno vertido a los demás es una constatación y, por tanto, un problema de versión real y física. Son los demás hombres los que, en una o en otra forma, se han entreverado, y han intervenido en mi vida. Este es el punto de partida.

El niño necesita *ayuda* y esta ayuda viene de los demás. Aquí está inscrito el fenómeno radical del encuentro con los demás⁵². La necesidad que el organismo tiene, en cuanto animal, de los demás, es para el sentir intelectual una *necesidad de socorro*. Por sentir precisamente la necesidad de socorro el hombre está constitutivamente abierto al otro, que son su madre y su padre.

«Al ser el hombre animal de realidades —afirma Zubiri—, precisamente por su dimensión de animal, está abierto a lo que en realidad forma parte de su vida en la que están ya los demás (...) La cuestión está en averiguar lo que de la realidad de los demás está formalmente en la realidad del niño»⁵³.

Una forma real y específica de como los demás están en la realidad del niño es configurándola. «Los demás van imprimiendo en mí la impronta de lo que ellos son, me van haciendo semejante a ellos. (...) los demás están en mí físicamente. (...) y están en mi vida configurando la realidad de mi propia vida y por tanto mi forma de auto-

⁵⁰ *Ibíd.*, pp. 224-225

⁵¹ Cfr. ZUBIRI, X., *El hombre, realidad social*, en *Sobre el hombre*, o.c., pp. 233ss y 244-275.

⁵² Por las mismas razones que el resto de los animales, el hombre se halla biológicamente vertido a un medio bióticamente humano. (...) El niño se encuentra primariamente vertido a algo, que es madre o hace sus veces, de donde el animal humano va a cobrar nutrición y en lo que va a encontrar amparo. Este fenómeno es puramente biológico, y en la medida en que está sentido por el niño, es una de las formas radicales de sentirse a sí mismo. Cfr. *Ibíd.* p. 235.

⁵³ *Ibíd.* p. 236-237. Al niño le afectan muchas cosas, unas más que otras. Y tiene experiencia de que unas cosas le evitan el disgusto o le dan gusto. Hay unas cosas mediadoras de otras. esas cosas le van dirigiendo sus pasos.

posesión (...) Es cuestión de realidad»⁵⁴. «Los demás es lo humano que hay en la vida del niño, y que desborda su realidad propia (...) Es una estructura constitutiva de lo humano, inmanente y trascendente a la vez en mi vida»⁵⁵.

La versión a los demás está biológicamente fundada; mucho antes de que un hombre se halle positivamente vertido hacia los demás, éstos ya se han incrustado en su vida⁵⁶.

2. La vinculación

El nexo que une al hombre con los demás es primariamente una unidad que el hombre no establece. Más bien el hombre se encuentra con que los demás ya han intervenido en su vida y ello por una exigencia natural del niño. Cuando el niño emerge en su primer acto intelectual se encuentra con que esa unidad está ya realizada. Abierto el niño de suyo a una necesidad de amparo, son los otros los que la han cerrado; la unidad del fenómeno es la unidad entre una necesidad y una ayuda. Precisamente porque esta unidad ya está dada, lo social es principio y no resultado⁵⁷.

El hombre queda —en el sentido que Zubiri atribuye a la palabra *quedar*— real y efectivamente ante lo humano como realidad. «Ese quedar ante lo humano en tanto que realidad es lo que temáticamente llamaré **vinculación**. El hombre está vinculado a los demás hombres cosa que no les pasa a las abejas o a las termitas»⁵⁸. «La realidad del hombre (...) queda formal y constitutivamente vinculada por su versión a los demás. La dimensión de realidad es inexorable. El hombre no está vinculado simplemente a lo que los demás hombres le dicen y le hacen, sino que está vinculado a que se lo dicen *en realidad* y se lo hacen *en realidad*. Y el hombre con esa realidad tiene que hacer su propia realidad. (...) Y por su propio carácter de realidad queda el hombre infinitamente abierto a toda otra forma de realidad social»⁵⁹.

Zubiri de sus análisis fenomenológicos concluye que el hombre es *vinculable* y *vinculado*. Pero el *vínculo efectivo* no le está dado por sí mismo sino por los demás. Y este vínculo efectivo en el que el hombre se encuentra, es la unidad primaria entre lo vinculante y el vínculo que lo vincula. Participa de algo añadido, pero que es a su vez una exigencia previa y natural del ser humano; no es otra cosa sino la realización de la plenitud del individuo. Esa es la vinculación. No es unión; es unidad primaria, física y real⁶⁰.

⁵⁴ *Ibídem* p. 238

⁵⁵ *Ibídem*, p. 240.

⁵⁶ Cfr. *Ibídem* p. 244. Zubiri sigue diciendo: «En el momento en el que el hombre, muy al comienzo de su vida, se hace cargo de esa realidad por medio de su inteligencia sentiente, se encuentra no con los demás hombres, pero sí con lo humano, que de una manera extrínseca ha venido modulando su vida de múltiples maneras».

⁵⁷ Cfr. *Ibídem*, pp. 251-253. En el contexto de la acción de los demás en uno aparece un haber vinculado más o menos a determinadas cosas concretas y que se parecen entre sí: son los demás hombres. Estos demás hombres no comienzan a funcionar dentro de la vida de uno en tanto que otros sino en tanto que *míos*.

⁵⁸ ZUBIRI, X., *El hombre, realidad social*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 253. La cita continúa: «que quedan puramente entreveradas en la labor que biológicamente realizan cada una por su cuenta, y de la que resulta la posibilidad de que vivan los demás animales».

⁵⁹ *Ibídem*, p. 254.

⁶⁰ Cfr. *Ibídem*, p. 254

Esa vinculación se refiere ante todo a los demás hombres. También a otras cosas físicas, como la tierra, el país, etc., en cuanto que constituyen su *morada*. En este momento Zubiri analiza ciertas experiencias relacionadas con la vinculación como son la *nostalgia o la añoranza*, que suponen *un echar de menos*, cuando el hombre se siente disminuido⁶¹.

Ahora bien ¿qué tipo de entidad tiene esa vinculación? Zubiri dialoga con Durkheim, como anteriormente dialogó con Rousseau o Hobbes, con Husserl o Scheler. Mi exposición al ser muy concreta se limita a exponer con nitidez el pensamiento zubiriano.

Constata que «no todo lo que hay en el individuo es individual, sino que hay en él cosas que le son superiores»⁶². Pero ¿en qué consiste la realidad de la dimensión social de los individuos?

Lo social no es realidad sustancial. Tampoco es imitación de los demás. «Los individuos —afirma Zubiri—, son el sustrato de lo social, pero lo social es pura y simplemente una unidad de vinculación de los hombres como forma de realidad. Mi realidad en tanto que realidad es la que está afectada por los demás hombres en tanto que realidad. Esto es lo que confiere carácter físico y real a la sociedad sin darle el carácter de sustancia»⁶³.

Ahora bien seguimos preguntando por esa vinculación: ¿qué estatuto ontológico tiene? Zubiri lo denomina *habitud*⁶⁴. Es «un hábito 'entitativo' de mi realidad en orden a la alteridad en tanto que real»⁶⁵. Es una cualidad entitativa, que cualifica intrínsecamente mi realidad sustantiva. El hombre está real y físicamente modulado por los demás. Por tanto el fenómeno social es la alteridad en tanto que está modulando entitativamente desde los demás hombres mi propia realidad humana. El contenido del fenómeno social es *lo humano* que desborda de mí; es *el haber humano recibido*; hay en mí algo que en cierto modo es extrínseco, porque ha venido de fuera.

Resumiendo Zubiri concluye. El contenido del nexo social «es una unidad cuya realidad es ser un modo, y cuyo carácter modal es ser una *hésis*, una *habitud* física y real de mi realidad en la alteridad con la realidad de los demás»⁶⁶.

Ahora bien esta vinculación a los demás no afecta directamente a los otros hombres en tanto que otros. El niño se encuentra entreverado con los demás, pero son los demás

⁶¹ Cfr. *Ibidem*, p. 255.

⁶² ZUBIRI, X., *El hombre, realidad social*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 257.

⁶³ *Ibidem*, p. 259.

⁶⁴ *Ibidem*, p. 259. *Habitud* o *hexis*, para Zubiri no es simplemente una manera de comportarse. Esos son hábitos operativos. Hay otros hábitos entitativos. Pone el ejemplo de una puerta deformada, que ha hecho vicio; ese vicio conforma no solo el modo de moverse la puerta sino su propia constitución. ¿Qué haría falta para que ese vicio de la puerta fuera un fenómeno social? se pregunta. Y contesta: Haría falta que la puerta se hiciera cargo de que tiene ese vicio por la acción de otros factores homogéneos a ella y que le afectan en lo que tiene de realidad sustantiva.

⁶⁵ *Ibidem*

⁶⁶ *Ibidem*, p. 260

los que se introducen en la vida del niño, y no en tanto que personas. Intervienen otorgando al niño un modo humano. Aquello a lo que primariamente está vinculado el hombre (en lo que consiste su hábito social) es algo que recae no sobre los demás hombres sino sobre *el haber humano*.

¿Qué es ese haber humano? Este haber humano es un modo de vida, una mentalidad y una tradición. El hombre se encuentra con un lenguaje, con instituciones, usos y costumbres. Algo así como lo que Hegel llamaba el espíritu objetivo al que daba realidad sustantiva. Pero ese haber humano no es una 'res' sustantiva. Es más bien poderes y posibilidades. Tampoco tiene razón propia. Es una inteligencia convertida en puro haber. No es mente sino *mentalidad: forma mentis*: el espíritu social no piensa ni intelige; es puramente la figura del haber inteligido y el haber pensado. Es el modo de pensar de cada cual pero afectado como modo por los demás.

Además de la mentalidad, que vine a ser un modo de vida el haber humano también tiene unos contenidos: es tradición.

Pero la habitud humana no está formada solo por el haber humano. Es una dimensión que procede de los que lo tienen, de los demás hombres. Y consiste en que estoy vertido a los demás en tanto que otros. Es lo que se llama la comunidad que tiene varias líneas: la pluralidad, la colectividad y la institución. Y además tiene otra dimensión: la comunidad que se da no entre individuos sino entre personas.

«Como personas los individuos no se organizan, se compenentran: ya no es mera comunidad sino comunión», afirma Zubiri. Entre personas lo que cuenta «es la mayor o menor *distanciación* (...) Las personas empiezan por ser nuestros próximos, nuestros *prójimos* (...) la compenetración se constituye en la línea de la distancia. Ahí sí que está en su lugar la *familia* como ámbito de proximidad de personas compenetradas, sobre el cual se va inscribiendo a lo largo del tiempo, de un modo positivo y negativo, la impresión de la realidad de las personas»⁶⁷.

Siendo el objetivo de esta comunicación el profundizar en el tipo de apertura que se da en el nivel personal, parece que entre personas cobra una especial importancia el ámbito familiar. Entonces habría que profundizar en las relaciones peculiares entre varón y mujer, que son las que dan inicio a la compenetración familiar. Zubiri no profundiza en ello. Únicamente añade que «la unión de las personas, como compenetración de personas no se realiza sólo en el amor sexual. Puede adoptar formas como la amistad⁶⁸». También entre varón y mujer hay diferentes tipos de relación familiar o de amistad. Por tanto queda someramente apuntado pero no bien analizado el modo en el que se realiza la compenetración, que se estructura en la línea del *nosotros, yo y el tú*.

Por otra parte habría que precisar la diferencia que existe entre esos dos tipos de forma de convivencia que dan lugar a la sociedad humana: la comunidad y la comunión o compenetración, que como se apunta no se dan separadas⁶⁹, y que son formas de apertura del yo a los otros.

⁶⁷ *Ibíd.*, p. 269

⁶⁸ ZUBIRI, X., *El hombre, realidad social*, en *Sobre el hombre*, o.c., p. 270.

⁶⁹ *Ibíd.*, p. 274

3. La apropiación

Preguntémonos finalmente por otro tipo de apertura del hombre, de la persona, a los otros y del enriquecimiento que cada uno adquiere de los otros. Esto Zubiri lo expresa con el nombre de *apropiación*.

La vida de cada cual es radicalmente inalienable. Vivir es poseerse. En eso consiste precisamente el núcleo del ser personal. Lo que ocurre —afirma Zubiri— es «que la realidad de cada hombre por el hecho de su versión a los demás, imprime a cada uno de esos hombres un carácter formal, en virtud del cual *cada hombre es cada cual*. (...) este modo es un modo real y positivo. Frente a 'otro' es como cada uno, real y físicamente, es cada cual»⁷⁰.

Ahora bien la alteridad no es mera pluralidad. «No es solamente que haya muchos hombres, sino que cada uno contribuya a cualificar su propia vida. Solamente entonces cada cual es cada cual. Es decir, no se puede ser cada cual si no se está inmerso constitutivamente en una alteridad y no simplemente en una multiplicidad numérica. (...) Solamente la inmersión real y positiva en el otro en tanto que otro, es decir en alteridad, es lo que confiere al tal su cualidad interna en virtud de la cual hablamos de cada cual. Para que haya cada cual es menester que haya vida propia, y que esta vida propia esté entre otras, modificada por ellas. Por consiguiente preguntarnos en qué consiste ser cada cual, equivale a preguntarnos cómo mi vida está cualificada en mi propia realidad por las vidas de los demás»⁷¹.

Se trata de mi propia vida, en tanto que modificada por la vida de los demás, que para ellos es también propia. Es decir es un tipo de apertura de uno hacia los demás de tal modo que los demás formen parte intrínseca de mi vida. Esta es una de las preguntas que se formulaban al principio de este trabajo.

A esta cuestión Zubiri contesta diciendo: «La manera positiva como la vida de los demás afecta a mi propia vida en tanto que propia, es justamente la *apropiación*. Solamente en la medida en que el hombre esté apropiándose la vida de los demás, cada uno es cada cual»⁷².

Ahora bien ¿en qué consiste la apropiación? «Por lo pronto la vida de los demás en toda su plenitud, es decir, en forma de autoposesión y autoconfiguración, es radicalmente inapropiable. Por mucho que yo me sienta identificado con la vida de los demás, jamás me apropiaré de la vida del otro, so pena de que el otrodesapareciera»⁷³.

Esto es interesante para analizar desde esta óptica el amor. Muchas veces se habla de la identificación con el amado. Bien, pero el amor no destruye la alteridad. El otro es otro como distinto de mí. Puedo estar unido a él pero lo importante del amor es que la unión no destruye la diferencia.

⁷⁰ *Ibidem*, pp. 302-303. Ese ser cada uno cada cual Zubiri le llama *monadización*. No entramos en ello para no complicar el texto.

⁷¹ ZUBIRI, X., *El hombre, realidad social*, en *Sobre el hombre*, o.c., pp. 304-305.

⁷² *Ibidem*, p. 305

⁷³ *Ibidem*. Apunta Zubiri que «esto teológicamente se da en la Trinidad, donde la apropiación es tal que la distinción numérica desaparece conservándose la cada-cualidad; una sola realidad y tres cadacuales».

«La alteridad como fuente de vida propia no es otra cosa sino que las otras vidas, las vidas de los otros, en tanto que me permiten hacer mi propia vida; es decir, en cuanto son *posibilidades mías*. La apropiación consiste formalmente en que hago de la vida de los demás una posibilidad de mi propia vida. (...) La apropiación recae formalmente sobre las posibilidades que me otorgan las vidas de los demás. No es un caso de potencias sino de posibilidades»⁷⁴.

Esta apropiación de posibilidades no consiste en que los demás hagan una especie de violencia sobre mí. se trata de que cada uno tiene diversas necesidades y es el otro el que viene a cubrir con su vida esas necesidades mías. «Precisamente la conjunción de una necesidad interna con la ayuda que aportan los demás, es la unidad radical en que se constituye la alteridad».

Es por tanto una apertura desde las propias necesidades que son inexorables, cómo me abro a la ayuda que los otros me pueden ofertar, y se podría decir viceversa. Porque con mi vida puedo aportar lo que otros necesitan. Así desde la realidad de la propia vida se ve cómo los demás pueden formar parte intrínseca de mi propia persona, al ayudarme a forjar la propia personalidad.

VII. CONCLUSIONES

Concluyendo o más bien reasumiendo, en este trabajo me he detenido en algunos aspectos de la persona humana en cuanto apertura a los demás.

1. En primer lugar, está la apertura de la sustantividad humana que al no estar constitutivamente enclavada en unas respuestas a unos estímulos se presenta como esencia abierta a su propia realidad.

2. Después he constatado la importancia que da Zubiri a la explicitación del concepto de persona. La realidad personal es ser realidad en propiedad, ser propiedad mía. Esta característica coincide en cierto modo con la descripción del carácter fundamental de la inteligencia, en virtud de la cual la persona se enfrenta con el resto de la realidad, y hasta con su propia realidad. La persona es autopropiedad gracias a la inteligencia.

3. Ser en propiedad ha sido denominado técnicamente en el lenguaje zubiriano como *suidad*. Para Zubiri las cosas reales son reales porque son 'de suyo'. Y entre ellas la realidad humana además de ser 'de suyo' es una realidad 'suya'.

4. Posteriormente me detengo en la distinción que hace Zubiri en la persona entre *personidad* y *personalidad*, distinción que emerge al diferenciar entre el plano estructural y el operativo. Desde el punto de vista entitativo la persona como personidad es un punto de partida. Sería imposible que tuviera personalidad quien no fuera ya estructuralmente persona.

Allí donde se tienen en cuenta los actos de la persona estamos en el terreno de la personalidad. Por otra parte los actos que realiza la persona imprimen en ella una

⁷⁴ *Ibidem*, p. 306.

cualidad, pues la persona en una o en otro forma se apropia de sus propios actos. Desde este punto de vista se puede decir que la persona está abierta a su propia realización.

5. Más adelante he analizado la conexión entre la persona y la libertad. La libertad es estudiada en Zubiri en tres sentidos: la libertad 'de', la libertad 'para' y la libertad 'en'. La libertad 'de' es entendida en un sentido de liberación de ciertas coacciones, impulsos, cosas, etc... que posibilita la libertad 'para', para ser sí mismo.

Ahora bien estos dos aspectos de la libertad son fundamentalmente operativos y por tanto se apoyan en otro sentido de la libertad que es constitutivo: la libertad 'en'.

Relacionando la persona con la libertad, Zubiri afirma taxativamente que esta libertad 'en', que es autoposesión coincide con lo que es ser persona, ser en propiedad, en el sentido de personidad.

6. Con esta declaración tenemos que tanto persona, como inteligencia, como libertad son elementos constitutivos de la realidad humana, difícilmente distinguibles en ese plano. En efecto, la persona es ser en propiedad, la inteligencia permite esa autopropiedad y la libertad 'en' viene a ser un nombre para designar la autoposesión. Estas tres características están a nivel trascendental. Aunque se distinguen nominalmente porque en el plano operativo tienen diverso sentido el inteligir o el querer hay un plano donde son difícilmente distinguibles porque forman una unidad que una de ellas hace posible a la otra. Libertad, inteligencia, persona son diversos nombres que designan la estructura ontológica y constitutiva, trascendental del ser humano.

7. Por último se recoge la relación entre la persona y su apertura a los demás considerando tres aspectos: 1) la versión a los demás, 2) la vinculación y en 3) lugar la apropiación.

Al principio preguntábamos si la apertura a los demás es parte constitutiva del ser personal. Pues bien, la contestación de Zubiri es taxativa: los demás con su autodefinición y su autoposesión «intervienen constitutivamente en mi vida». Los demás con la situación que me crean en la convivencia están ya en mí mismo.

Y ese estar de los demás en mí es algo que ocurre simultáneamente a la diferencia que hay entre yo y los demás. Yo no soy los demás. Mi vida es la mía, no la de los otros. Mi autoposesión es la mía y no la de los demás. Estamos, por tanto, ante una singular condición aparentemente paradójica, porque los demás están implicados en mí y, a la vez, yo no soy los demás.

1) Esto lleva a analizar lo que Zubiri denomina *la versión a los demás*. La primera característica de este estar vertido a los demás es la constatación de un hecho: son los demás los que han intervenido en mi vida, aún antes de que yo haya podido ser consciente de ello.

Y esto porque el niño *necesita* ayuda y esa ayuda viene de los demás. Cuando se despierta el sentir inteligente se advierte la necesidad de *socorro*, que lleva a sentir que el ser humano está constitutivamente abierto al otro, desde el más cercano: la madre. Esta versión a los demás está biológicamente fundada.

2) El nexo que une al ser humano con los demás es una *unidad* que el hombre no establece conscientemente. A ese nexo Zubiri lo llama *vinculación*. La vinculación es una unidad primaria, física y real. Abierto el niño a la necesidad de amparo, son los otros los que la han cerrado. Zubiri analiza cómo el hombre es un ser vinculable y vinculado y el vínculo efectivo no es dado por sí sino por los demás.

Preguntándose de qué tipo es esa vinculación constata que no todo lo que hay en el individuo es individual, sino que en él hay cosas que le son superiores, como el vínculo social.

Respecto al estatuto ontológico de esa vinculación Zubiri lo denomina *habitud entitativa*, no operativa, que califica intrínsecamente mi realidad sustantiva.

Ahora bien los otros, en este caso, no intervienen en tanto que personas, sino en tanto que otros hombres que transmiten al niño un *haber humano* que consiste en una mentalidad y una tradición, lo cual les permite formar una comunidad.

Las relaciones de las personas en tanto que personas forman no tanto una comunidad sino una comunión. Las personas no se asocian, se compenentran. Ahí la familia y la amistad cobran especial relieve como ámbitos de personas compenentradas.

3) Por último he señalado otro tipo de apertura de la persona a los otros que Zubiri denomina *apropiación*.

Se trata de mi propia vida modificada y enriquecida por la vida de los demás, que para ellos es también propia. La alteridad como fuente de vida propia no es otra cosa sino que las otras vidas de los otros en tanto que me permiten hacer mi propia vida; es decir, en cuanto posibilidades más. La apropiación recae formalmente sobre las posibilidades que me otorgan las vidas de los demás. Es más o menos la vinculación entre necesidad/ayuda en la que la vida de los demás, abierta a la mía, permite que yo forje mi propia personalidad.

8. Tras estos apuntes de la antropología de Zubiri concluyo que, así como la persona está bien conceptualizada, haría falta desarrollar más el aspecto de las relaciones interpersonales, explicando con más detenimiento ese tipo peculiar de convivencia que consiste en la comunión de personas compenentradas y qué tipo de afectación supone esa relación en la constitución de la persona.

DIEZ AÑOS DE ACADÉMICO

LUIS VÁZQUEZ FERNÁNDEZ

«Fugit irreparabile tempus...»

Virgilio

«Fugit hora, ora...»

Inscripción en relojes

Han pasado diez años desde que la *Academia de Doctores* abrió para mí su sapiencia.
El tiempo fue dejando su huella, su evidencia,
en mis ojos, mis manos, mi palabra en bisemia.

La ilusión juvenil que en mis venas fluía
ha ido dejando el paso a un pensar más maduro.
Dos Presidentes fueron «al inmortal seguro»,
y sus sombras me asombran en la fiel *Teología*.

¿Es el tiempo el que pasa, o nosotros acaso
somos los que pasamos, paso a paso, hora a hora?
Oigo un llanto de niño que en mi espíritu aflora,
junto al cercano anciano que vislumbro a mi paso.

Jorge Manrique ha visto, como nadie, que el río
va fluyendo, desliza sus aguas a la inmensa
hondura de la mar. ¡Y qué poco se piensa
que el río es nuestra vida, es la mía, Dios mío!

¿Es la vida un engaño? ¿Va empezando la muerte
cuando empieza la vida? Irremisiblemente
nuestro espíritu atisba, nuestro corazón siente
que un viento huracanado nos gana, es el más fuerte.

Ese viento —ese aliento— ¿no es el *elán vital*
que en nosotros pervive, ocultando el beleño,
el narcótico negro que envuelve nuestro ensueño,
y, aliento tras aliento, es veneno fatal?

Nacemos, nos ofrecen gratis el mismo *ser*,
sin contar con nosotros, que éramos sólo idea
en la *mente divina*. Hacemos la tarea
—que es el vivir—, y pronto comienza el fenecer.

Cuando ya nos sentíamos dueños de medio mundo,
construyendo proyectos, dignos de un creador,
se incrusta en nuestras venas el fuego del dolor,
y el manantial da paso al pozo más profundo.

Y un día nos iremos, como dijo el poeta
Juan Ramón, mientras *quedan los pájaros cantando*.
Todo seguirá el ritmo de siempre, como cuando
yo creaba ese *cosmos* que otro, ignoto, interpreta.

Tampoco cuenta nadie con algo tan tremendo
como es *el que yo muera*: ¿A nadie le interesa?
¿Nuestro *cuerpo* perece y el *alma* queda ilesa?
Me moriré del todo, aunque siga existiendo...

Sólo el *Hijo del Hombre*, el que murió en la cruz,
da sentido a mi muerte, como lo da a mi vida.
¿Y el que se dice *agnóstico*, y descubre su herida,
no es igual que yo mismo portador de *la luz*?

Todos somos iguales ante las sepulturas:
¡A todos nos vincula la más grisácea *duda*!
En el *instante-límite* no habrá un ángel que acuda
a arraigar la *certeza perenne*, sin fisuras.

El creyente la *duda soporta*, y el ateo
aleja el pensamiento que a veces le importuna.
Uno contempla el *cielo*, y el otro, con su luna,
—en claroscuro tenue— me dice: «Nada veo».

Pero todos, formados de la tierra en su seno,
y el hálito divino, estamos hermanados.
¿Somos muy diferentes cuando estamos callados,
o cuando la *Palabra* da su sentido pleno?

¡Oh Dios de *mi palabra*, oh Dios de *tu silencio*,
danos a cada uno la muerte que nos toca!
¡Señor, que *tu Misterio* purifique mi boca,
y hable de ti, silente, como te reverencio!

Madrid, primavera de 1999

EL POETA DÁMASO NOS OFRECE, AL FINAL DE SU VIDA, «DUDA Y AMOR SOBRE EL SER SUPREMO»

LUIS VÁZQUEZ FERNÁNDEZ

1. INTRODUCCIÓN

Es Dámaso Alonso uno de los grandes *humanistas* que hemos tenido en este final del siglo XX español. Su rica personalidad multifacética —de poeta, crítico literario, historiador de la Literatura, filólogo, estilista, lingüista...— estuvo marcada por su humanismo y amor a las Letras hispánicas, con incursiones en las extrañas. Recientemente he publicado un amplio estudio sobre este aspecto, centrado en su primordial faceta de creador¹.

En él destaco cómo su *Obra poética* es profundamente «humanista» y «religiosa», en un sentido amplio, paradójico, con su dialéctica permanente. Pero ya desde su inicial *Poemas puros. Poemillas de la ciudad* (1921), pasando por *Oscura noticia* (1944), *Hijos de la ira* (1944), *Hombre y Dios* (1955), *Gozos de la vista* (1981), y sus *Antologías*, con comentarios personales —muy valiosos—, desde 1956, el poeta *centraba su inspiración* en su visión del «ser humano» como un «polo correlativo del misterio de Dios». Siempre aparece afirmada *la dignidad suprema del hombre* —como «delegado del Creador»— y *la «oscura noticia del Misterio de Dios, Ser Supremo»*².

Hoy quiero fijarme en su última obra creadora, en la que el planteamiento *vital y existencial* de Dámaso *cambia de horizonte*, para encastillarse, de nuevo, «en sí mismo», ahora inmerso en la *duda* sobre la «inmortalidad» y «el ser Supremo», salvada, sin embargo siempre, por *el amor*.

¹ Luis Vázquez Fernández, *El humanismo religioso de Dámaso Alonso*, Revista «Estudios», Madrid 1999, 456 pp.

² Véanse, sobre todo, los capítulos I —donde aparece la «religación, desarraigo y humanismo» y el capítulo VI— que subraya la *conciencia de dignidad y libertad* humana, así como el IX y X, en los que se estudia al poeta como «un ser que habla *de Dios*» y «*con Dios*».

2. LAS DUDAS DAMASIANAS

2.1. La no eternidad del alma

Dámaso, culto y gran lector, sabía muy bien que la concepción del ser humano como un componente de «cuerpo» y «alma» es de origen *platónico* más que *bíblico*. En este caso, su afirmación de que el alma muere con el cuerpo puede ser admitida³. Pero esto no supone, ciertamente, la desaparición o aniquilación del ser humano con la muerte. En Cristo alcanzamos la «Vida eterna», con su poder de resurrección. Si muere «esto que tenemos de corruptible», sabemos que seremos transformados «en lo incorruptible, en Cristo Jesús» (San Pablo).

La primera afirmación de Dámaso, en su *Pedida al Señor* es:

*¡Ah, Señor! ¡Si tú existes!
«Señor» omnipotente, me presento tristísimo.
Perdóname, «Señor», éste es mi pensamiento,
lo que juzgo verdad:
Creo verdad la idea de la muerte
del alma, al punto mismo en que se muere el cuerpo.
Pienso que esto es lo exacto, lo verídico. (DyA, 539)⁴.*

Esto es, pues, lo que Dámaso —tristísimamente— cree, con toda honradez. Y lo proclama en estos versos libres, en los que hay más «razonamiento» que «afectividad poética». Naturalmente, el poeta no puede autocontradecirse con su pensar. ¿Es exacto? Vitalmente, racionalmente —un poco al modo unamuniano— sí lo es. Subjetivamente es lo que está creyendo, y cantando, como anticipando su *propio responso*. Este libro de «postrimerías» me recuerda al de Juan Ramón Jiménez: *Dios deseante y deseado*. Cada uno desde su propio estilo de poetizar: JRJ más intimista, interiorizando a «su Dios». Dámaso más racionante, sintiendo su soledad en trance de muerte.

2.2. Duda permanente sobre su afirmación negativa: Transfondo unamuniano

Pero, a renglón seguido reconoce: «Mas me ocurre, me duele, que esto sea, / o que se considere, como auténtico. / ¡Qué tristeza, qué lástima, alma mía, / qué bien quisiera eterna conocerte!». Naturalmente, no podría ser de otro modo: En el fondo de nosotros subyace un ansia de inmortalidad. Y va unida a la fe en la *existencia de Dios*. El poeta aquí tiene *marchita su inspiración*, la de los demás poemas anteriores. No sabe si existe Dios, ni dónde existe. Y, lleno de contradicciones interiores, con todo insistirá:

³ Cf. este texto transparente: «El Nuevo Testamento se sitúa básicamente en la tradición veterotestamentaria; no se concede ninguna importancia a la *contraposición* entre cuerpo y alma (*1Pe*, 2,11): la muerte y resurrección afectan al hombre total (1Cor, 15,35ss)». Mt 16,26 y Mc 8,37 hablan del «alma» como *lo más precioso que el hombre puede perder*. El «cuerpo», opuesto al alma equivale a «carne» (*sark*). A.Grabner, *Vocabulario práctico de la Biblia*, Herder, Barcelona 1975, p. 49.

⁴ Con esta sigla citaré siempre «Duda y amor sobre el ser Supremo». La numeración subsiguiente corresponde a la página en la edición reciente de su *Poesía*, Gredos, Madrid 1998.

« Mas a pesar de esa terrible duda, / *yo te amo, yo te adoro*». *¡Va a salvarse por el amor!* Lo que su razón niega lo afirma su corazón. Él bien quisiera —y se lo pide a ese Dios, de cuya existencia duda— «la eterna vida al alma». Le faltan, sin embargo, las «pruebas», y reitera su tristeza: «mi alma se deshará cuando se muera el cuerpo».

Y esta idea le viene de atrás. *¡La había escrito ya antes!* Es lo que llama «la gran mentira (alegre, absurda): que mi alma será viva eternamente». Y razona: Eso vale asimismo para cualquier animal (que tiene su alma propia, es un «ser animado»). La vida «nace y muere» en el gato y en el hombre. (Lo cual no es incierto. Pero las «otras deducciones» fallan, incluso racionalmente planteadas). Dámaso, como Unamuno, *quiere creer*. Pero la fe, que es un don de Dios mismo, no ha arraigado suficientemente en ambos. Tampoco podemos afirmar que no existiese; *¡Éste es, y será siempre, el misterio del ser humano ante Dios!*

Antes de nacer —1898, un 22 de octubre— no existía —dice— su alma. Al morir, desaparecerá de nuevo. Escribe esto a sus 86 años, cansado de la vida, fatigado. Como Unamuno podría escribir su epitafio previo: «Méteme, Padre eterno en tu pecho, / misterioso hogar. / Dormiré allí, pues vengo deshecho / de tanto bregar». En ambos *la paradoja*. El no poder prescindir de nombrar a Dios en los momentos-límite de su existencia. El no poder prescindir de solicitar auxilio, para sobrevivir, para eternizarse. Para Dámaso, el morir del cuerpo es suciedad, podredumbre; mientras que el del alma: encantador, «cesa como el viento». Pero esto, que cree ser *la verdad*, no lo desea. Si bien se consuela pensando que en la «Nada» nada duele, no se sufre. Está sufriendo ahora, mientras crea, sin creer del todo; haciendo la distinción entre «lo creído y lo deseado». Cree que el alma muere para siempre. Desea, quisiera, que no fuese así, «que el alma se eternizara». Y todavía más: «que se aunara con el *Ser* omnipotente».

En este mar de dudas, en la *Segunda parte* del comienzo poemático postula, idealizadamente, la «eternidad del alma». Su idea ya la manifestó, y vuelve, reiterativamente, sobre ella, para que no nos quede —no *le quede a él*— duda alguna. Pero no lo logra. De ahí que afirme: «Puede ser falsa». Y lo anhela vivamente: «¡Ojalá sea!». Y a ese Ser —qu no sabe siquiera si existe— *le pide que no sea cierta su idea de la muerte del alma*. Y le «busca» y le «adora». (No, en Dámaso no existe nunca *actitud irreverente o blasfematoria*; incluso cuando niega, siguiendo su idea o su razón). Reconoce haberle pedido a Dios «que existiera». (De nuevo, nos vuelve a la memoria, el soneto de Unamuno: *La oración del ateo*:

OYE mi ruego Tú, Dios que no existes,
y en tu nada recoje estas mis quejas,
Tú que a los pobres hombres nunca dejas
sin consuelo de engaño. No resistes
a nuestro ruego y nuestro anhelo vistas.
Cuando Tú de mi mente más te alejas,
más recuerdo las plácidas consejas
con que mi alma endulzóme noches tristes.
¡Qué grande eres, mi Dios! Eres tan grande
que no eres sino Idea; es muy angosta
la realidad por mucho que se expande
para abarcarte Sufro yo a tu costa,

Dios no existente, pues si Tú existieras
existiría yo también de veras.⁵

Más que de influencias, se trata de dos actitudes vitales semejantes: Para existir uno mismo «eternamente» hace falta que *Dios exista*. En el fondo, la duda sobre la «inmortalidad del alma» surge de la duda de la existencia de Dios mismo).

2.3. La afirmación divina y el alma eternal, alcanzadas por «vía de amor»

Dámaso —creo poder afirmarlo con objetividad— *sigue siendo, con todo, más poeta que Unamuno*. El vasco «filosofa» más cuando poetiza; a veces es duro su verso, y tiene su palabra *menos afectividad*. Dámaso, por ejemplo, insiste mucho en el *amor a Dios*:

*Mi amor te ama; ¡que existas!
Te lo pido con toda tu inmensa intensidad.*

Y, por un «instante de gracia» piensa que puede ser que el alma sea inmortal. Entonces canta a su «Alma eterna y el gran *Ser*». Dios y las almas serían eternos para siempre, ambos muy unidos, casi identificándose, casi un sólo «Ser». Eternidad nos une. Se ve —ya sólo alma— en puro portento, en el delirio: Mientras el cuerpo se pudre, el alma sobrevuela los espacios siderales; lo conoce todo; lo visita todo; lo ve todo, ya sin materia alguna, «inmensidad de luz».

Sin sentido alguno lo capta todo; ¡pura maravilla! A través de lo que denomina «efluvios», el alma es libre y vive, enseñoreándose de todo, con su Dios. El «espíritu» es ahora un don divino, y en él todo se explica, se implica, se explicita, se hace patente. Dámaso se ve ya muerto, pero —vivo en el alma— se encontrará los flujos, los efluvios, ante todo de *sus padres*. De modo especial con su madre:

*Antes, antes que nada,
yo pensaré en mi muerta pobre
y en su inmenso cariño.
Ay, decirle yo a ella mi tristeza;
llorar mis graves faltas, madre mía...*

Salta de gozo al pensar que podrá «verla». ¿Pero es esto posible? ¿Dónde están los ojos? Y se pregunta: ¿Cómo estaremos juntos? La respuesta se esperaba: «Mi espíritu estará junto al fluido / suyo; fluirá también mi pena: / Su amor junto a mi amor en duelo». Dámaso —cosa que estaba ausente en Unamuno, menos «poeta», menos afectivo, menos cordial— se imagina, como había hecho en un bellissimo poema «A la madre», de *Hijos de la ira*, como un niño ante la madre; y deja emanar su dolor por no haber respondido como debiera, en vida, a su materno amor sin límites:

*«Perdóname, mamá, ahora aquí, sí, ya gracia,
mi espíritu y tu espíritu,
plena esencia de amor entre los dos, ya eterno».*

⁵ Miguel de Unamuno, *Obras completas, VI: Poesía*, Escelicer, Madrid 1966, p. 359. Esto lo firma Unamuno en Salamanca, a 26 de setiembre de 1910.

Y viene luego el padre, a quien apenas conoció. ¡Su muerte fue, en efecto, prematura! Debe, pues, preguntarse: «¿Viví yo con mi padre?». Recuerda, eso sí, muy bien la fecha de su muerte: «Murió el nueve de mayo, mil novecientos uno, / y la edad era sólo veintinueve sus años. / muy poca era mi edad, niño, cuando él murió: / aún menos de dos años y medio yo tenía». Quizá —piensa— pudo hablar «un poquito» con él. Mas no tiene memoria alguna de ello. Pasaron 83 años desde entonces. De él le habló su madre. Sí, lo lleva en el alma muy adentro:

*No recuerdo su cuerpo, ni su voz, ni su cara.
¡Ay, pobre padre mío!*

Juntos allá en ese mundo del espíritu eterno, exclamará: «Gracias, padre, mamá, nos salvará lo eterno: / felices ya seremos, felices ya los tres».

No olvida a sus mejores amigos que murieron. No deja de ser significativo el que comience por Miguel de Unamuno, que hace renglones acabo de citar. Le llama «hombre grande en tu espíritu y tus letras, / oh Miguel de Unamuno, te he admirado, / y tú, en sorpresa, me has querido siempre». Se admira de eso mismo: «Yo era un pobre muchacho. Gracias por tu cariño». Vienen luego sus «enormes amigos»: Jorge Guillén —fallecido hacía meses— y Pedro Salinas —hacía ya 33 largos años—, admirados ambos por sus versos ardientes. Y Amado Alonso —con quien, no sin frecuencia, le identificaban los extraños: ¡de él tiene recibido cartas, confundiendo ambos nombres sus autores! Le admiraba Dámaso por su «ciencia literaria y lingüística». Se querían como hermanos. Dámaso, más joven, le dedica este verso: «*Tú, noble; tú el más grande que yo he conocido*». Le sigue Federico García Lorca, «en la terrible guerra vilmente asesinado». Todos le querían por su gracejo y jovialidad. ¿Quién, sino Leopoldo Panero podría seguirle luego? De él me dijo, en cierta ocasión, cuando preparaba mi tesis doctoral, y le hacía frecuentes visitas, desde París y Madrid: «Panero, Panero, ese sí que era católico». Dámaso sabe que muchos —incluso su propia familia le fue ingrata— le maltrataron de palabra. Ahora quiere resarcir esas injusticias con su palabra en corazón bañada: «Cuántos odios/ te han insultado, pobre amigo mío. / Yo amé con gran ardor tu poesía / y tu tierno cariño». Luego Vicente Gaos viene a su mente, él que se había «inclinado piadoso al gran *Señor* del orbe» antes del trance último. Solicita su intercesión: «¡apiádate también de mí, pide mi ayuda!». ¡Y el «dulce» Rafael Ferreres!

Pero va a consagrarle un poema entero a Vicente Aleixandre, «ahora distinto». Sucedió que fallece después de haber escrito «DyA». Desde 1917 su amor mutuo tuvo permanente realidad. Sin duda que Aleixandre fue para Dámaso el *primer gran amigo*. A Dámaso le debía, por lo demás, Aleixandre, su entrega a la poesía. Dámaso fue quien puso en sus manos de convaleciente el primer libro de versos que Aleixandre releyó con fruición. El poeta era nada menos que Rubén Darío. Después ambos —Dámaso en mayor grado— celebrarían y darían a conocer al mundo las exquisiteces de la poesía de Góngora, el despreciado, durante siglos, por los academicistas del castellano.

Después de este selecto elenco de amigos, Dámaso imagina que se relacionará asimismo con los *Literatos muertos*, aquellos a quienes estudió, con pasión y capacidad comprensiva. Piensa, sobre todo, en los del «Siglo de Oro español»: Miguel de Cervantes, San Juan de la Cruz, Fray Luis de León, Lope de Vega, Francisco de Quevedo, Luis

de Góngora...¡Y los medievales! ¡Y los franceses, ingleses, alemanes, italianos, latinos y griegos, remontando las aguas del tiempo y las diversas lenguas de cultura!

Y querrá conocer todos los Continentes, con sus bellezas propias. Y el universo terrestre, y también el gran universo, con sus posibles seres. Todo el cosmos. Los espacios todos interestelares, y las galaxias, en sus inmensas formaciones y desarrollos. ¡Cómo gozaría penetrando en los intersticios del Universo!

Y le pide al Señor «que exista», pues Dámaso le ama. Y así podrían reunirse todos los seres, gozosa, gloriosamente. La hipótesis acaba en oración:

*Oh, gran «Señor», te pido la verdad:
Creo, cierto, que existes.
¿Lo creo?
Sí, ¿lo creo? Sí. ¿Te amo y te bendigo?*

Pasa entonces a su *Tercera Parte*, sobre la primera y la segunda. Ha sido «un encanto y alegría» supremos. Y sin embargo, se *acrecienta la duda, ahora más férrea, «más fuerte, intensísima, enorme»*. No sólo se rechaza, o se cuestiona, «el alma eterna»; sino que va más lejos y niega al *alma*. ¡Sólo existe *el cuerpo!* ¡El «cuerpo» y el «cerebro»! Son en sí mismos una maravilla de perfección. Los sentidos, con sus especificidades; el «habla» humana que en ellos tiene asiento. ¡Y la *memoria!* ¡Incluso una especie de memoria casi universal, «la religión», aceptada en familia, en pueblos, en estados, «religiones diversas»! Y, llegados aquí, juzga, de nuevo, que no existe el alma: «Lo que mueve la vida son lazos de *cerebro*». *Potenciación, pues, del «cerebro» como centro de «ideas» y «deseos»*.

2.4. Duda sobre las «dudas»: ¡La salvación —poética y humana— en el último verso!

La última parte se resuelve en «*dudas sobre las tres partes*». Duda de su propia duda. Se incrusta la «duda» en el centro mismo de su canción tristísima. Por eso llega a pensar —con «*duda*»— *que el alma puede ser eterna*. Puede explicarse con «milagro religioso». Dios puede, al fin, «vencer». No habla Dámaso aquí de «convencer».

Y llegamos —tras este periplo de afirmaciones y negaciones, de afirmaciones negativas, de negaciones afirmativas, de dudas sobre todo— a los interrogantes divinos: *¿Existes ¿No existes?*

Pide y reza que sí. Pero no sabe a quién: «Problema es infinito». Dámaso está «amando» y «rezando» a ese Dios de quien duda que exista. Se debate entre la «ignorancia» y el «deseo», el «sueño». El no desea «inmensidad-materia»: ¡El hombre es *otra cosa!*

Le llama «espíritu» a su realidad más honda e inmaterial. ¿Por qué? Responde, al fin, el poeta —lejos de «raciocinios» poco intuitivos, que le retuvieron en largas «disquisiciones clamorosas»:

«Porque en mi vida espíritu es lo sumo». Sigue ignorando, mas la superación viene por un doble acto reafirmado a lo largo del poema: «Yo, sin saber, *te adoro, te deseo*».

Y sigue avanzando, ya hacia el final perenne: «Esto es máximo amor: mi amor te inunda; / el alma se me irradia en adorarte; / mi vida es tuya sólo (¿ya no dudo?)». Proclama, por lo tanto, al final el poeta que a Dios «adora», «le desea», y, sobre todo, «le ama». Es el último verso el que salva al poema. ¡Es el último verso el que salva al poeta! Y *Duda y amor sobre el Ser Supremo* finaliza con esta aseveración sincera, «muy damasiana», que nos deja sobrecogidos por su profunda confianza:

«Amor, no sé si existes. Tuyo, te amo».

Lo que la inteligencia no llegó a comprender; lo que la mente humana y poética no alcanzó a descifrar, se logra por la gracia del *Amor*. Es lo que san Pablo llama *el camino mejor*: «Aunque hable todas las lenguas..., si no tengo *amor*, soy un metal estridente o un patillo estruendoso... ¡si no tengo *amor* no soy nada!» (1Cor, 13, 1-2).

Dámaso —ya desde sus primeros poemas y libros poéticos— mantuvo siempre esa dialéctica del «misterio divino» y de la «entrega cordial a su amor». Fue, por lo demás, siempre muy respetuoso con «lo sagrado». Lo cual no impide, ciertamente, que sus afirmaciones estén entreveradas de «desarraigos» y posturas que algunos llamaron —aunque a él nunca le agradaron— «existencialistas». Su «autonominación» se reitera en diversos poemas de distintas épocas: Es una constante. Y puede interpretarse como signo de sinceridad. En ocasiones llega a la «autoimprecación», viéndose como representante del ser humano, en general. Es significativo el que *Hijos de la ira* sea título tomado de San pablo: «Et eramus natura filii irae sicut et ceteri...» Ef 2, 3. También nosotros —los «puros», los «vencedores», los «poderosos», los «bien vistos», los que ganamos la «guerra civil/incivil», los ganadores de la «2ª guerra mundial»...— éramos, como ellos, *hijos de la ira*.

3. CONCLUSIÓN

El último libro poemático —un largo poema unitario, dando vueltas a la noria de la duda/ afirmación, sueño idealizante/ despertar con la misma pesadilla, duda de las dudas / amor—, si bien, a primera vista, parece diferente de su anterior obra creadora, en realidad viene a estar en la misma onda y tonalidad. Quizá a veces nos suene a «metal estridente», en frase paulina; pero la capacidad de «dudar de su propia duda», y, genialmente, de lanzarse al regazo del «Amor», desde la «docta ignorancia» de algunos Padres de la Iglesia, y de nuestros mejores «místicos», nos desvela a un Dámaso poeta de gran calibre, humanista de hondo calado. La muerte, en perspectiva cercana, es para todos negrura, abismo, caos. Sólo el *Amor amado* puede dar una salida airosa al horizonte cerrado por densos nubarrones de «duda», común a todos: creyentes y no creyentes. Hace años, en una obra teológica significativa, traducida al francés, *Foi chrétienne hier et aujourd'hui* (1969), Ratzinger afirmaba: «El creyente como el incrédulo, cada uno a su manera, conocerá la duda y la fe, si no buscan autoengañarse y disimular ante sí la verdad de su ser. Nadie puede escapar enteramente a la fe; en uno la fe estará presente *contra* la duda, en otro, *gracias* a la duda y *bajo la forma* de duda. Es una ley fundamental del destino humano, el que se realice su existencia en esta dialéctica permanente entre la duda y la fe, entre la tentación y la certeza»⁶.

⁶ *Ob. Cit.*, pp. 12-13.

Quien esto afirmó pasó, hace tiempo, de *teólogo docente*, a *máximo representante* del organismo vaticano de la *Doctrina de la fe*. Supongo que seguirá aceptando lo que entonces calificó como «ley fundamental del destino humano». Se dijo también que «la fe consistía en ser capaz de soportar dudas». Pues bien, Dámaso, poeta, ante las puertas de su propia muerte, tuvo el ánimo de entregarnos su último mensaje de esta ley fundamental del destino humano, captada bajo su personalísima óptica. Víctor García de la Concha —que reconoce que «acaso le apremió a publicarlo un compromiso de sinceridad y verdad»— añade a continuación su juicio sintetizador: «En todo caso, ni precisa ni resiste comentario: no habla allí un poeta, sino una desvalida voz de hombre, un hilillo delgado de voz que se retuerce en lucubraciones sobre el Ser»⁷. Este juicio bastante negativo, desde el punto de vista poético, se matiza con la declaración final: «Hay, con todo, un verso, el último, que produce un destello fulgurante»⁸. Dámaso sigue mereciendo nuestro máximo respeto, incluso en este libro entreverado de «lucubraciones».

⁷ «Invención de la luz: La poesía de Dámaso Alonso», en *Damaso Alonso: Poesía y otros textos literarios*, Gredos, Madrid 1998, p.XXXIV.

⁸ *Ibidem*, p. XXXV. Yo añadiría que ya otros, anteriores, nos producían similar sensación y fulgor.

EL AGUA BIEN ECONÓMICO

JOSÉ GONZÁLEZ PAZ

PONGÁMONOS DE ACUERDO

Vivimos en una época de tan acelerada evolución en todos los ordenes, que, a veces, resulta difícil distinguir entre *lo que sabemos* y *lo que creemos saber*. El viejo aforismo que *de la discusión nace la luz*, requería, al menos, que la discusión fuese sosegada y que se compartieran algunos principios comunes.

El primero de todos es el de la palabra (Al principio era el Verbo, San Juan 1.1)

Hasta bien entrada la Edad Moderna, el latín es la lengua de la cultura europea, como lo fuera del Imperio Romano. Casi son innecesarias las disquisiciones sobre el sentido de las palabras y se puede pasar directamente a la controversia de las ideas. La lengua por excelencia (el latín) es un vehículo para entenderse. La muerte formal del Sacro Imperio y la eclosión de las lenguas nacionales (¡ay Lutero y su traducción de la Biblia al alemán!), las erige en seña de diferenciación, dentro de un proceso que agudiza el romanticismo decimonónico con su impulso, reconstrucción o reelaboración de las lenguas regionales.

No es ocioso, por tanto, que quiera esclarecer los conceptos de partida que van a informar mi monólogo, ya que no me es posible, en esta ocasión, contrastarlos con los de mis posibles lectores.

Podría parecer que profundizar sobre qué es el agua resulta innecesario, cuando no ofensivo. Sin embargo, al enfrentarme al tema, creo necesario identificar de qué agua vamos a tratar; que no es, simplemente, la definida por su fórmula química (H_2O), o por su función biológica en la constitución y funcionamiento de los seres vivos. Más que del agua, será de las aguas existentes en la naturaleza en sus tres estados físicos, pero fundamentalmente en estado líquido; no el agua pura, sino el *agua real*, con sus elementos físicos y químicos incorporados (disueltos, en suspensión o en arrastre), el agua con su potencial energético de posición, el agua con las fuerzas dinámicas de sus movimientos y sus flujos, el agua que aprovechamos y el agua de la que tenemos que defendernos.

No cabe duda de que el agua es un *bien natural*. Bien, en cuanto satisface *necesidades* a partir de su función como principio de vida; *natural* en cuanto existe en la naturaleza y es ésta la que le proporciona a través del bien conocido *ciclo del agua*.

Nuestro problema es investigar sobre, si es *también un bien económico*, y el papel que, en tal caso, juega o puede jugar en la actividad económica. Son pues estos dos conceptos los que es conveniente fijar con precisión, para asentar nuestro discurso sobre bases firmes.

Como es bien sabido, el *ciclo del agua* es un ciclo cerrado que integran las etapas por las que pasa el agua (precipitación, infiltración, escorrentía, evapotranspiración, formación de nubes, precipitación). Respecto a los conceptos económicos transcribiré simplemente, mis propias definiciones¹:

- Bien, es todo aquello capaz de satisfacer una necesidad. Si se trata de una necesidad económica los medios capaces de satisfacerla reciben el nombre de *bienes económicos*.
- *Necesidad humana* (que es la que vamos a tomar en consideración), es la sensación de una carencia, unida al deseo de eliminarla.
- *Necesidad económica*, es aquella cuya satisfacción requiere la utilización de medios escasos, es decir, no disponibles en cuantía ilimitada. Precisa de actos materiales e implica *actividad económica*.
- *Actividad económica*, es la encaminada a la satisfacción de las necesidades económicas. Se rige por el principio de escasez.
- El *bien económico*, ha de ofrecer la característica de ser escaso y regulable. Es precisa o posible la realización de una actividad económica para obtenerle. Los que no tienen esas características se designan con el nombre de *bienes libres*.
- *Utilidad*, es la aptitud de los bienes en orden a la satisfacción de las necesidades.
- *Valor*, es la importancia concedida por los sujetos económicos a los bienes que satisfacen sus necesidades. La combinación de las características de utilidad y rareza (escasez) de un bien es lo que determina su valor. *Valor y bien económico* son conceptos afines.

Ahora sí podemos ya relacionar los conceptos de *agua* y de *bien económico*, también sobre bases firmes.

LAS AGUAS NO CONTINENTALES

Aunque el resto de los artículos que componen el presente número es natural que estén absolutamente centrados en los problemas de uso, aprovechamiento y gestión de las aguas dulces continentales, no parece ocioso ofrecer algunas consideraciones relativas a las aguas no continentales (marinas), en cuanto a su posible consideración como bien económico.

¹ José González Paz. Curso de Economía. Publicaciones del Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos.

La característica diferencial de las aguas marinas es el hecho de que su contenido en sales las hace inadecuadas para la satisfacción directa o indirecta de necesidades de carácter biológico de gran número de especies, a lo largo de las cadenas tróficas, y finalmente, de las necesidades humanas de tal carácter, dentro o fuera de las actividades productivas. Los principios de utilidad, escasez y posible regulación, definitorios de su consideración como bien económico y determinantes de su valor económico, han de ser aplicados de modo preciso y no genérico. Así se apunta, a continuación, en la exploración de una serie de casos positivos, dentro de una especial consideración del valor económico, entendido como inherente al de todo bien que entra o puede entrar en el «comercio de las cosas».

De alguna forma, natural o social, los bienes han de ofrecer caracteres de escasez y posible regulación, para que las aguas marinas adquieran el carácter de bien económico, valorable por encima de su utilidad genérica como bien libre.

La *escasez natural* puede identificarse mediante la consideración de ciertas circunstancias singulares tales como:

- excepcional amplitud de la carrera de marea en ciertas costas, muy favorables para su aprovechamiento en centrales mareomotrices o molinos de mar.
- reducido número de áreas marinas en que la conjunción de favorables confluencias de corrientes, temperaturas, oxigenación, amplitud y profundidad de la plataforma submarina, etc. sustentan una excepcional riqueza biótica (Las corrientes pueden ser de agua como el GulfStream o corrientes migratorias inducidas).
- reducido número de parajes con condiciones excepcionales para determinados usos capaces de inducir una actividad económica. Van desde las bahías, ensenadas y rías capaces de ofrecer abrigo a la navegación marítima, a las costas que facilitan la concentración de actividades deportivas (surf, windsurf, pesca submarina, etc.)
- áreas en que la conjunción de fondos marinos poco profundos (plataforma marina) y riquezas minerales naturales (petróleo, gas, en el futuro nódulos) hacen posible la explotación de tales riquezas.
- zonas costeras singulares en que el agua supone un atractivo destacado para su explotación residencial, turística o productiva. Desde marinas y puertos deportivos a urbanizaciones (tipo Ampuriabrava, en Gerona), instalaciones salinas, cetáceas, viveros de moluscos o de peces, almadrabas, etc.

Cabe decir, no obstante, que lo que permite la aparición de un valor económico es, más que el agua marina en sí, la «conjunción tierra-agua».

La *posible regulación* ofrece dos vertientes claramente diferenciadas, aunque las mismas actúen generalmente conexionadas: una regulación técnica y una regulación jurídica, siendo esta última, con mucho, la más importante.

Como ejemplos de *regulación técnica* cabe citar:

- la ejercida por la presa y embalse del estrecho de Rance, para la espectacular central mareomotriz francesa de igual nombre, introduciendo tecnologías infinitamente superiores a las de los viejos molinos tradicionales, que existieron en el pasado en la misma zona.
- las infraestructuras portuarias creando o mejorando zonas abrigadas y aportando facilidades de acceso marítimo (calados, bocanas, etc.)
- aplicación de «tecnologías of shore», cada vez más avanzadas, para la explotación de los fondos marinos.
- actuaciones técnicas sobre el litoral (defensa de costas, regeneración de playas, correcciones sobre la dinámica litoral, etc.)

La *regulación jurídica* comprende aspectos tan fundamentales como:

- limitación al libre uso de las superficies y fondos marinos, tanto en cuanto a la tecnología pesquera (arrastre, redes de deriva, volantas, etc.) como a la realización o limitación de capturas (parada biológica, especies protegidas, tamaños mínimos, etc.), o al establecimiento de instalaciones productivas fijas o semifijas (almadrabas, salinas, viveros, etc.), o de uso humano (espacios litorales insulares o submarinos protegidos)
- extensión creciente y generalizada de las *aguas territoriales* (de las 3 o 6 millas tradicionales a las 200 millas actuales), que han permitido a los Estados obtener unas rentas del mar, expulsando a los pescadores foráneos tradicionales (Terranova), cobrando derechos de pesca e imponiendo otras cargas y gabelas (Maruecos), etc.

Lo cierto es que la regulación jurídica ha transformado, en buena parte, las aguas del mar de un bien libre en un bien económico, haciéndolas pasar para ello, a ser un bien relativamente escaso.

Pero es hora ya de dejar el agua del mar y que, como corresponde a este foro, pasemos a las aguas continentales en su condición de bien económico.

LAS «OTRAS AGUAS»

Pero antes de centrarnos en la categoría genérica de las aguas continentales, bajo el prisma cuantitativo de las aguas dulces tradicionalmente aprovechadas en usos agrarios y consumos humanos, interesa incorporar aquí algunas leves consideraciones sobre lo que me he permitido bautizar como «las otras aguas», en vez de relegar su consideración al estrambote final de un soneto imperfecto.

Tales aguas incluyen muy distintos tipos.

Las aguas salobres son las más próximas, en su composición química, al agua del mar y como ella pueden ser materia prima para la obtención de distintas sales (y aún otros compuestos). Las clásicas salinas tradicionales (hoy en gran parte inexplotadas)

tuvieron extraordinaria importancia en puntos interiores de localización de manantiales de aguas que arrastraban sales procedentes de ciertas formaciones geológicas singulares. Dichas aguas tenían el carácter de *bien económico* en razón a su rareza, a la posibilidad de una simple manipulación (en general mediante la evaporación natural), o sea, a su regulación dentro de un proceso productivo y a que las dificultades y carestía de los transportes interiores las hacían competitivas, en el seno de sistemas de producción artesanales, aun contando con desventajas climáticas, frente a las salinas ubicadas en ciertas partes del litoral marino.

Pocas son las que siguen en producción, como es quizá el caso de las salinas del pueblo de Gerri de la Sal en Lérida (que visité hace algunos años); pero el rastro de su importancia pasada puede seguirse en la abundancia de topónimos que engloban la voz —salinas—, como es por ejemplo el caso de Salinas de Medinaceli, en Soria. Su carácter de *bien económico* dio lugar, en su tiempo, a que su explotación fuera objeto de regalía por parte de la Corona, o se incorporara a los *derechos señoriales*. De su valor económico dió fe, en su tiempo, el conocido *estanco de la sal*; pero dicho valor no se basaba únicamente en la regulación jurídica de las salinas, sino en la existencia (o no) de una fuente de suministro adecuada, que permitía a su poseedor participar también en la «renta de la sal».

El caso de las aguas salobres interiores pone de manifiesto que hay *aguas continentales* a las que se puede calificar de bien económico en cuanto son *input* de una actividad económica concreta. Cuando son objeto de procesos de desalinización, cabe admitir que tienen un valor económico positivo en cuanto no existan alternativas de abastecimiento más favorables. Cuando resulta necesaria su eliminación, para que no afecten desfavorablemente a procesos posteriores de uso o consumo, puede aceptarse que tienen un valor económico negativo, por cuanto obligan a incurrir en costos adicionales.

Todo ello no impide que también pueda hablarse del posible *valor ecológico* de tales aguas, como sustentadoras de áreas en que se asientan biotopos singulares, pero éste es tema que merecería ser tratado aparte, superando el ámbito de lo económico aquí considerado. Sin embargo, ello no empece, para que apuntemos algunas leves consideraciones en que el valor económico de las aguas interiores (y por tanto su consideración como bien económico) se sustenta o incide en aspectos ecológicos ligados a las condiciones propias del agua, tanto químicas como físicas.

Los campos a considerar en los que el agua alcanza el carácter de bien económico son variados, amplios y multiformes dentro de este grupo restringido de «las otras aguas». Son los casos identificables como se expone a continuación:

- *aguas mineromedicinales*; o simples *aguas de mesa*, objeto de comercialización (incluida o no su manipulación) para consumo humano diferenciado de los abastecimientos colectivos generales. Son apreciadas por sus características singulares (gas ocluido, sales en disolución, sabor, menor grado de dureza, garantía de salubridad, etc.)
- *aguas de uso médico* tradicional; en las que se fundamenta la explotación de balnearios para el tratamiento de diversas dolencias, o con el carácter más amplio de medicina preventiva.

- *campos de nieve*; que suponen un creciente atractivo turístico y han dado lugar a toda una industria compleja, de la que las estaciones de montaña son tan sólo la parte más visible, pero en modo alguno la única. Hay que tener en cuenta que la nieve tuvo anteriormente un valor económico en la fabricación de helados y sorbetes y en aplicaciones médicas como antipirético, lo que dió base a la extendida existencia de los llamados «pozos de la nieve», e incluso a la promulgación de cierta Real Cédula, por la que se concedía, a cierto avisgado granadino, autorización exclusiva para la explotación (bajándola a la ciudad) de la nieve de Sierra Nevada.
- *aguas bravas*; como las existentes en ciertos tramos fluviales, sobre los que se viene desarrollando un creciente turismo deportivo y de aventura, cuyo uso sufriría anulación (o al menos modificación), si resultaran anegados por un embalse. Este es el elemento nuevo (y por hoy olvidado) a tomar en consideración en la correspondiente evaluación económica de proyectos.
- *cotos fluviales*; objeto de alguna forma de explotación económica (incluidas las piscifactorías) en que el agua es el *input* básico.
- *láminas de agua*; que actúan como elementos de revalorización de actuaciones urbanizadoras o inmobiliarias y, por tanto, justificativos de su creación, diferenciándolas de aquellas otras superficies acuáticas en las que tales láminas aparecen como simple consecuencia de los sistemas tecnológicos tradicionales (por ejemplo en embalse y contraembalses para usos diversos).

INTERMEDIO

Llegados a este punto podemos limitarnos, ya, a las aguas que, de siempre, han centrado las consideraciones del Ingeniero, debido a sus usos tradicionales cuantitativamente más importantes, incluyendo (aunque sea más moderno) el uso en refrigeración industrial (especialmente centrales térmicas).

EL AGUA Y LA ECONOMÍA

El *principio de racionalidad* impone que en el logro de todo fin cuya consecución exige incurrir en un coste, éste último se acepta si el fin ofrece un valor superior. En términos generales, *coste* viene a ser sinónimo de *sacrificio*, de insatisfacción ineludible para el logro de un fin superior; cuando dicho coste se traduce en pérdidas de valor económico resulta ser un *coste económico o costo*.

El agua pasa de ser un bien natural a ser un bien económico cuando ofrece suficiente grado de regulación, de acuerdo con el correspondiente tipo de aprovechamiento. Su valor económico difiere según que el paso de recursos naturales a disponibilidades se apoye tan sólo en la regulación natural o ésta resulte mejorada por la acción del hombre.

Tradicionalmente, pequeños barcos portugueses a remo y vela navegaban (no sin riesgo) el Duero portugués, desde Oporto a la «raya española». Por esa vía llegaron

a Wellington cañones y suministros que hicieron posible la derrota de las tropas francesas en Arapiles, junto a la capital salmantina. Pero los esforzados marineros portugueses, que monopolizaban el reducido tráfico de mercancías con España por esa zona, y el más importante y próspero de transportar los afamados vinos de Oporto, sabían perfectamente que, a pesar de su pericia y arrojo, su Duero sólo podía navegarse (con su correspondiente tributo de vidas humanas) en época de *aguas medias* nunca con *aguas altas* (que inundaban periódicamente el barrio marino de Oporto), ni con *aguas bajas* (cuando se acrecentaban los peligros de un irregular fondo rocoso).

El Duero internacional fue siempre infranqueable y sus «hoces» prácticamente inaccesibles, hasta que se construyeron los actuales embalses hidroeléctricos a lo largo de todo el tramo, que han hecho posible una frontera transversalmente más permeable. La regulación introducida por tales embalse, junto a los correspondientes a las centrales de agua fluyente construidas en el Duero portugués (equipadas con esclusas), han logrado hacer de la navegación en dicho tramo una actividad económica normal, borrando su carácter de arriesgada aventura y abriendo ciertas posibilidades al desarrollo de un turismo con base en la navegación fluvial de recreo.

En un país como España, donde en amplias zonas geográficas nuestros ríos no son otra cosa que cauces de avenida, sembradores de destrucción y de muerte, sus aguas difícilmente pueden tener un valor económico positivo, puesto que la regulación natural es mínima; en especial (nuestros ríos también «veranean») si el agua desaparece en el estío. ¿Cuántos Río Seco y Rambla Seca, Arroyo Seco refleja nuestra toponimia? Entre nosotros, la regulación de nuestros ríos es condición indispensable para que sus aguas adquieran plena consideración de bien económico, capaz de recibir una valoración positiva.

Diríamos más: positiva no sólo desde el punto de vista económico, sino también en los campos de la ecología del medioambiente natural y social.

Las aguas (tal como aquí se consideran) juegan en la economía bajo tres aspectos principales:

1. Satisfaciendo directamente necesidades humanas de carácter primario, como la bebida y la higiene. Así ha sido desde el principio de los tiempos y, cuando ya las sociedades humanas alcanzan un cierto grado de organización, aparecen actividades directamente ligadas a satisfacer las correspondientes demandas. Fueron en principio los «aguadores», que aseguraban la conexión entre las fuentes y los domicilios; lo son hoy, los sistemas de abastecimiento, que buscaron asegurar un servicio tecnificado de disponibilidad inmediata de agua, de calidad superior a la ofrecida por la propia naturaleza y sin restricciones en la demanda.
2. Aportando un factor de producción, absolutamente necesario en multitud de procesos. Desde el riego de cultivos, en climas o periodos secos, a cubrir las necesidades de bebida del ganado o los requerimientos de múltiples industrias, como «input» imprescindible en los correspondientes procedimientos fabriles (incluidas las necesidades de refrigeración). Tales necesidades pueden hacer referencia tanto a aspectos cuantitativos como cualitativos. Aunque los prime-

ros sean, con mucho, los más importantes, los segundos no son en modo alguno despreciables para la mayor parte de los procesos productivos; y en algunos casos son dirimientes para decidir sobre la localización óptima de una industria en concreto. (Por ejemplo, la de fibras artificiales que tanteó primero su localización en Valladolid con aguas del Canal de Castilla y cambió su turbiedad por las aguas cristalinas del Ebro en Miranda)

3. Obligando a ciertas actividades económicas relacionadas con el agua, en que ésta no tiene estrictamente el carácter de *bien de consumo* ni el de *bien de producción*. Son, en general, las ligadas más directamente a la *calidad de vida*, y sus objetivos pueden ser tanto cuantitativos como cualitativos, y estar centrados en cuatro alternativas fundamentales; utilización, conservación, corrección o eliminación.

Creemos que no hace falta insistir en los aspectos 1 y 2, pero quizás no sea ocioso dedicar algunos comentarios al 3, por su presunto carácter marginal de costo sin contrapartida estrictamente económica.

Hasta la segunda mitad del siglo XX, la ingeniería hidráulica se enfrentaba a nuestras lagunas, marismas y humedales de todo tipo como si fueran un error de la naturaleza, que fuera preciso corregir en honor al progreso.

Con una visión excesivamente economista se abordaba su desecación para aumentar la superficie cultivable; objetivo al que el Estado prestaba su mejor apoyo (concesiones, ayudas, etc.). Así se desecaron, entre otras, la laguna de La Janda, la de la Nava, la de Ginzo de Limia y estuvo a punto de serlo la de Sariñera y bastantes y conocidas marismas (en especial en el Guadalquivir) y albuferas litorales.

Con una visión que entonces se calificaba de social, pero que también tenía motivaciones económicas, a las clásicas *transformaciones en regadío* fueron bien pronto incorporadas unas *localizadas campañas de lucha antipalúdica*; como bien recogen, por ejemplo, las publicaciones pioneras de nuestras Confederaciones Hidrográficas. La medicina preventiva aplicada se vió pronto acompañada por la mejora tecnológica en el diseño de los propios regadíos, complementando la red de acequias menores (única contemplada por el agricultor cuando debía construirlas a su costa) con una red de cauces de drenaje, azarbes y desagües, correctamente proyectados para reducir el estancamiento de las aguas. Se mejoraba así, además, la productividad del suelo y se reducía la prevención (a veces fundada) del agricultor de secano para aceptar la transformación en regadío, e incluso para utilizar las tierras en los nuevos cultivos.

En uno y otro caso, el objetivo final era la eliminación de las aguas, para lo cual era preciso hacer frente a los costos correspondientes (Por cierto, que es lo único que hacen los holandeses en la hidráulica de sus «polders»)

La alternativa de corrección se refiere, tanto a actuaciones sobre la cantidad de agua disponible en los correspondientes tiempos y lugares, como sobre aspectos relacionados con la calidad de la misma; pero también con el propio entorno inmediato en el que el agua discurre o permanece.

Bajo esta consideración cabe plantear aspectos tan singulares como:

- los embalses de regulación constituyen inversiones innecesarias (y sus gastos de explotación, costos no evitables) para acercar nuestros ríos al «patrón medio centroeuropeo» en cuanto a variabilidad de caudales. No es correcto que la Unión Europea, pretenda imponernos el llamado «principio de recuperación íntegra del coste»; como pago por el usuario, que incluye incluso los de gestión por parte de las administraciones públicas (y la constitución de reservas de autofinanciación para futuras mejoras y ampliaciones). En especial si, en nuestro caso, es preciso incluir, en el mismo, los costos de regulación que no son precisos en el escenario centroeuropeo. Mantener, por un día más, la vigencia de nuestro muy legal y muy apreciado (por la Administración) *canon de regulación*² es un profundo error y un grave obstáculo a la correcta homologación de nuestro escenario hidráulica en el contexto de una Directiva Comunitaria como la propugnada.
- las necesidades de depuración de las aguas usadas o residuales raramente se justifican por los límites de calidad admisibles correspondientes a sus posteriores utilidades como bien económico estricto, incluso bajo una visión ampliada que tomara en consideración, por ejemplo, los costos evitados en el campo de la salud, o los beneficios económicos del uso recreativo de los cursos o masas de agua receptores. Pero el tratamiento y depuración de las aguas usadas (prefiero este nombre al de residuales) constituye una actividad económica, en la que éstas constituyen un *input* y las ya tratadas el *output* del correspondiente proceso productivo.

La alternativa de conservación ha irrumpido con fuerza en la valoración de fines sociales en nuestros días. Bajo versiones distintas —no ya concordantes sino tan siquiera convergentes—, parece existir un clamor (en ocasiones justificado) a favor de la conservación de la naturaleza, lo que implica la conservación del agua, porque sin agua sólo puede existir una naturaleza muerta (y no es ésta la que más preocupa en todo caso)

Tal como recoge nuestro refranero las intenciones suelen ser buenas, pero no se puede asegurar lo mismo de las acciones, sobre todo cuando éstas se reivindican desde posturas radicales, escasamente racionalistas y en muchas ocasiones, absolutamente utópicas. Dado que la naturaleza original de las cosas no es perfecta ni inmutable por sí misma, nuestra postura no puede traducirse en un *conservacionismo a ultranza*, cuando no en una verdadera *recreación de una naturaleza soñada*, sin consideración a los costes (económicos y no económicos) de tal actitud vital.

Bajo la óptica de la conservación, el agua constituye un bien económico en cuanto hace necesaria una actividad económica para el logro de un fin predeterminado; ya se trate de compatibilizar los usos agrícolas y los ecológicos (aves migratorias) en el ámbito de la Laguna de Sariñera, de realimentar artificialmente las Tablas de Daimiel, o de restaurar o proteger determinados humedales.

Finalmente, la alternativa de utilización en los aspectos relacionados con la *calidad de vida*, encierra también actividades económicas necesarias y, en principio, altamente diversificadas. Limitándonos a exponer una primera «lista informativa», ésta recogería aspectos tales como:

² Al menos en su forma actual.

- tratamiento de márgenes fluviales.
- utilización turístico-deportiva de cursos de agua y embalses (en especial navegación y pesca) así como de los espacios colindantes.
- creación de láminas de agua para la revalorización de espacios de ocio.
- conservación y restauración del patrimonio hidráulico de carácter histórico-artístico.
- realización de actividades espeleológicas, en cuanto correspondan a formaciones que siguen siendo modeladas por el agua.

LA ECONOMÍA DEL AGUA

Como todo bien económico el agua tiene un *precio*, sin que éste deba ser, forzosamente, un *precio de mercado*. Tal precio puede tener el carácter de pura *renta de escasez* análoga a la clásica y bien conocida *renta de la tierra*, o corresponderse, preferentemente, con el cómputo de los costos en que es preciso incurrir para convertir el *recurso natural agua* en *disponibilidades reguladas*, útiles para alcanzar los objetivos fijados respecto a su utilización (de acuerdo con la vieja tesis ricardiana). En uno y otro caso, la primera interrogante que se presenta es, ni más ni menos, que la de establecer quién debe pagar el precio del agua. Ya se ha indicado que la postura de la Unión Europea, según la última versión (por el momento) de su Directiva Marco sobre el Agua, mantiene el principio de la «recuperación íntegra del coste a través del pago por el usuario». Pero aun aceptando tal principio, sin o con la corrección ya apuntada de nuestras singulares necesidades de regulación y las de reequilibrio hidráulico entre cuencas, el problema no queda resuelto, en tanto en cuanto no se identifiquen correctamente *los usuarios* y no se cuantifiquen adecuadamente los *costes monetarios* (costos).

A mi modo de ver, el concepto de *usuario* no debe aplicarse restrictivamente, limitándolo al primer utilizador del agua, sino que en tal categoría deben entrar, objetivamente, todos los beneficiados por el uso, tanto directo como indirecto, de las disponibilidades hidráulicas. Para los beneficiarios directos existen soluciones correctas (o cuando menos objetivas), estudiadas para el caso de aprovechamientos hidráulicos de fines múltiples, tales como los recogidos en los trabajos del Simposio Internacional Agua Siglo XXI, celebrado en Madrid en septiembre de 1980³.

Sin entrar, por puras razones de espacio, en la evaluación de los costos, centraremos la atención solamente sobre los beneficiarios, y con referencia a aprovechamientos hidráulicos construidos, «prima facie», con una sola finalidad concreta. Lo haremos, simplemente, enunciando los interrogantes a responder en los siguientes casos típicos, escogidos a título de ejemplo:

— *Embalse hidroeléctrico puro.*

La Administración o Administraciones Públicas establecen, en los pliegos de condiciones de la correspondiente concesión, una serie de restricciones y condicionantes

³ Precisamente el autor de este artículo fue relator general de las ponencias y comunicaciones presentadas sobre dicho tema.

que, en general suponen un coste extra para el concesionario; generalmente sin otra compensación económica que la inherente al propio hecho concesional. La singularidad de cada «cahier de charges» (como dirían los franceses) no permite apreciar si existe o no un tratamiento coherente con las formas de uso del agua, con las posibilidades de usos sucesivos de los caudales turbinados, o con los efectos desiguales de las distintas formas de explotación.

Nuestro famoso y tradicional *canon de regulación* no tiene la misma justificación en su aplicación a una central fluyente, a la que se garantice «de verdad» un mínimo de caudal, que a otra (que aún las hay) que funcionen por *turbinadas*, a partir de una mínima capacidad de embalse propio, o que a la gran central con una capacidad de embalse suficiente para asegurar su propia regulación de caudales. En pura equidad, la asunción de costos no debería ser la misma para una central dotada de contraembalse de regulación, que para otra que carece de él y además trabaja en un régimen de *energía de puntas*.

— Embalse para riego.

En una primera apreciación podría pensarse que, tratándose de un uso consuntivo, no debe caber duda en la imputación plena de los costos al regante. Para no caer en tal simplificación, podemos recordar aspectos tales como:

- La utilización del embalse para asegurar, aguas abajo, la permanencia de un *caudal ecológico* mínimo predeterminado, no asegurado por el río en su estado natural (caudal detraído al riego)
- La utilidad de las aguas infiltradas en las zonas de riego, respecto a la *alimentación de acuíferos* (que aprovecharán otros), o a la conservación de niveles freáticos (de utilidad para terceros)
- La superficie regada (y por tanto el caudal total utilizado) no puede ser estrictamente imputados a la existencia y forma de explotación del embalse. La función de éste es introducir un elemento de regulación que permite incrementar la superficie regable con los caudales disponibles con el río natural (sin regulaciones aguas arriba), que no tienen por qué ser forzosamente nulos.
- El embalse, como elemento de regulación, aumenta la seguridad y la garantía de que los terrenos situados aguas abajo no sean dañados (o lo sean menos) por riadas e inundaciones. Frente a esa ventaja, la desventaja de que lo sean por causa de una rotura de la presa aparece como casi despreciable en términos puramente estadísticos.
- Todo embalse y toda zona de riego inducen unos microclimas que, en general, mejoran la calidad de vida en las zonas esteparias áridas y semiáridas en que se localizan preferentemente. Por otra parte, el uso del agua en actividades productivas o de ocio, aumenta el nivel de vida de la zona y favorece un desarrollo sostenible al facilitar los pertinentes cambios estructurales.

— *Embalse para abastecimiento.*

En líneas generales señalaremos, por ejemplo, los siguientes puntos:

- Identificación con el aspecto antes expuesto relativo al caudal ecológico.
- Las aguas devueltas a los cauces, si son adecuadamente depuradas (como resulta obligado), pueden mejorar los caracteres físicos y químicos de las aguas naturales a las que se adicionan, aportando un impacto favorable sobre el medio físico y social (vuelve el salmón) ¿Su costo debe ser imputado sólo al consumidor urbano?
- El abastecimiento de las grandes ciudades introduce un peculiar elemento de regulación dada la reducida variabilidad estacional de las correspondientes demandas. Ciertamente supone la introducción de un embalse virtual de regulación en el sistema general (caso de Madrid, por ejemplo).

Con estos apuntes queda de manifiesto que, en puridad, no existen aprovechamientos hidráulicos que, en su explotación, puedan considerarse como correspondientes al modelo económico teórico de la producción simple, encaminada a la obtención de un producto concreto y en el que el resto de los posibles *outputs* se consideran subproductos sin valor económico, cuya eliminación comporta unos costos adicionales en la mayor parte de los casos. En la economía del agua, las externalidades (positivas o negativas) tienen un indudable valor económico, y por ello toda infraestructura hidráulica de cierta importancia se corresponde con el tipo de aprovechamiento hidráulico de fines múltiples, aunque el uso principal haya sido el único tomado en consideración el decidir sobre su construcción.

Por tanto, no vale la pena tratar específicamente aspectos más concretos concernientes a otros tipos de embalse como de los de regulación pura o los destinados al abastecimiento. Sea cual sea su objetivo principal, siempre se alcanzan, o pueden alcanzarse con una correcta explotación, fines múltiples, que tienen una valoración económica y un valor social. Ambas valoraciones dependerán de las condiciones naturales del entorno en que el embalse actúa (cualquiera que sea la forma) sobre la disponibilidad de los recursos hidráulicos existentes.

La característica más relevante e influyente sobre el valor del agua es la correspondiente a su escasez. Así, con carácter general, será un bien máspreciado en las áreas geográficas de clima desértico o semidesértico que en las de clima húmedo; En razón de su escasez absoluta en el caso de las primeras. Para las segundas el problema puede ser, por el contrario el exceso de recursos y su falta de regulación natural, que se pueden traducir, fácilmente, en fuente de daños, cuya superación, mitigación, o simple asunción, otorga al agua un valor negativo en su estado natural, lo que confirma su carácter absolutamente singular como bien económico.

Sin embargo, tienen aún más importancia (salvo casos extremos) las circunstancias de escasez relativa. Se entiende por tal la calificación resultante de la comparación entre las disponibilidades del agua, que constituyen la oferta de agua posible como *bien regulado* natural o artificialmente, y la demanda de agua, globalmente considerada para usos productivos o ambientales. Esta se integra por tres tipos de

demandas diferenciadas: la demanda efectiva, la demanda potencial y la demanda opcional.

La *demanda efectiva* viene dada por los volúmenes precisos para el adecuado servicio de los aprovechamientos existentes: regadíos, abastecimientos, usos industriales, etc. La *demanda potencial* es la adicional previsible, en las áreas del *desarrollo económico* y del *desarrollo social*, para las zonas de posible abastecimiento en términos de viabilidad técnica y de deficiencia económica. La *demanda opcional* corresponde básicamente a la posibilidad de una utilización ecológica, o en actividades de ocio, de los recursos hidráulicos existentes.

Establecer un correcto *balance oferta-demanda* de recursos hidráulicos precisa tomar en consideración aspectos tales como:

- *Las disponibilidades* constituyen, en cada momento la oferta efectiva. Transformar recursos en disponibilidades siempre supone un coste y, en general, un coste (coste económico) que alguien debe asumir.
- *La demanda efectiva* o actual no puede entenderse desligada de su correspondencia con los distintos precios del agua soportados por los demandantes. La demanda puede ser muy rígida (por ejemplo en abastecimientos) y más elástica (respecto al precio) en otros usos (por ejemplo en regadíos)
- *La demanda potencial* puede analizarse en condiciones de precio análogas a las presentes, a niveles distintos de precio que no superen el precio de fuga correspondiente a demanda nula, o bajo el principio de asunción total de los costes por el usuario principal (y siempre bajo la óptica de que el agua demandada constituye un input en los procesos selectivos.)
- *La demanda opcional* aparece una vez superadas situaciones de necesidad extrema, o es impuesta en razón de prioridades sociales o políticas. Las disponibilidades detraídas de otros usos, o que precisen de regulación adicional para el servicio de esta demanda, representan un coste que no puede dejar de ser asumido.
- *En economía del agua las demandas no se traducen íntegramente en consumos.* Estos son máximos en el caso de los regadíos y mínimos (nulos) en aprovechamientos hidroeléctricos. Los retornos de agua se incorporan a los recursos aguas abajo (y a los acuíferos), y plantean problemas de pérdida de calidad del agua que deben ser abordados y resueltos entre límites razonables

¿QUIÉN PAGA EL PRECIO DEL AGUA?

La primera y más inmediata contestación es que el precio del agua, entendido como coste a asumir por su disponibilidad y uso en cantidad y calidad adecuadas, es soportado por el conjunto de la sociedad. Pero ésta no es una respuesta esclarecedora y, por ello, la pregunta puede plantearse bajo dos alternativas:

¿Debe el usuario principal pagar un precio que cubra la totalidad de los costos?

¿Debe la sociedad como tal (y en su nombre las Administraciones Públicas) asumir parte de dichos costos?

Responder a ello nos lleva al tema general de cómo deben financiarse y explotarse las infraestructuras generales, lo que no puede caber en los estrechos límites de este discurso. Pero, sin embargo, si podemos aportar algunas áreas de reflexión para el futuro.

Históricamente, tales infraestructuras se realizan por decisión del poder Público; como graciosa donación, de una parte, y, de otra, como obligación impuesta respecto a su financiación o a su misma construcción (prestación obligatoria). Hay una contrapartida compensatoria a favor de quienes, con una u otra justificación, mantienen la titularidad de la infraestructura, la cual se traduce en la percepción de *portazgos*, a pagar por los usuarios de las mismas, en el más conocido caso de los caminos y carreteras.

Llegado el siglo XIX se produce en Europa, no sólo el triunfo del liberalismo, sino una verdadera revolución conceptual respecto al binomio individuo-sociedad, que lleva a múltiples revisiones en el tratamiento y consideración de las infraestructuras; bajo formas curiosas cuando no contradictorias. Se favorece, por ejemplo, la permeabilidad territorial con la prohibición que se impone en relación al cobro de portazgos, incluido el «derecho señorial», existente por ejemplo en relación al vado para el paso del Duero en Vadocondes (Burgos). Se promueve entre tanto, la construcción de caminos y ferrocarriles, por particulares, como negocio industrial, tal y como reflejara, hace cien años, el ilustre ingeniero de caminos D. Pablo de Alzola en su «Monografía de los caminos de Vizcaya».

A lo largo del siglo XX las sucesivas crisis económicas y los procesos inflacionistas agudos van a ir echando en manos del Estado —como administrador de la sociedad—, no sólo la carga, más o menos plena, de las infraestructuras, sino también de sectores y empresas industriales en crisis, ampliando (incluso en exceso) el concepto de servicio público. Limitándonos a España y centrándonos en las infraestructuras hidráulicas, en torno a la mitad del siglo el Estado rescata (previo pago), por ejemplo, los canales del Esla y del Henares, se introduce en el campo de la hidroelectricidad (ENHER, es un caso) y plantea distintas personalidades jurídicas sucesivas para el Canal de Isabel II (también como ejemplo).

En el mismo umbral del siglo XXI la *filosofía económica* prevalente ha entronizado al mercado como nueva «Diosa de la razón», que arriesga conducir a una pandemia generalizada, sólo contenida por las aún imprecisas (y aún más discutidas) limitaciones impuestas en razón de la persistencia ineludible de una forma política nueva: *el Estado de bienestar*.

La «contaminación» (sí así puede llamarse) alcanza en especial a la Unión Europea, tal como queda expuesta en su Libro Blanco sobre «Tasas equitativas por la utilización de infraestructuras», con relación a las infraestructuras de transporte, o en el contenido de su Directiva Marco sobre el Agua, manteniendo el *principio de recuperación íntegra del coste*, en el que llega a incluir, incluso, pagos por el usuario para la constitución de reservas para futuras mejoras y aplicaciones.

El peligro que encierra tal principio es el de la tácita reducción de la consideración de usuario al usuario principal o básico, con olvido de los beneficiarios colaterales y de la misma sociedad en su conjunto. Aquel ha de pechar con costos (incluidos los «financieros virtuales») que responden a:

- Necesidades de regulación para que nuestros ríos sean homologables hasta cierto punto, con los centroeuropeos y resulte razonable la aplicación de una normativa común sobre precios del agua.
- Servicio a demandas ecológicas, que benefician realmente al conjunto de la sociedad (incluyendo las derivadas de la civilización del ocio)
- Imposición de condiciones severas sobre la calidad de los vertidos y las aguas infiltradas a los freáticos; cuya demanda para abastecimiento (la de estas últimas) es mucho menor que en el resto de Europa.
- Gratuidad social de las externalidades favorables.

COMENTARIO FINAL

Profundizar en los aspectos concernientes al precio del agua rebasa con mucho los límites de esta aportación personal al tema básico de consideración del agua como bien económico. Nuestras reservas intelectuales son máximas si se quiere considerar el precio como un simple precio de mercado y aun más si para ello se produce una revolucionaria privatización del agua, alterando, sin limitaciones, su carácter de bien social, objeto de concesión reglada y específica, como la que se plantea actualmente en España con el llamado «mercado del agua».

Pero, aunque siempre guste personalmente de recordar a Kipling, yo no diría que «ésta es otra historia», más o menos tan transcendente que las del pasado. Es la historia inquietante e imprevisible de la economía del agua en España, al inicio del siglo XXI y en el seno de la Unión Europea.

PASADO, PRESENTE Y FUTURO DE LA ECONOMÍA DEL BIENESTAR *

JOSÉ GONZÁLEZ PAZ

LA RAÍZ DEL PROBLEMA

La locución **economía del bienestar**, concita hoy un conjunto disforme de posiciones encontradas en el campo de la política, que no se fundamentan en la existencia de defensores y detractores de tal concepto, sino en las divergencias profundas en lo que unos y otros entienden, al respecto, sobre su propia esencia y sobre las posibilidades o límites de su realización práctica.

El problema estriba en que algo que nace como una elaboración intelectual dentro de la ciencia económica, resulta pronto prohiado por la acción política, para actuar como **banderín de enganche** en la captura de votos populares, con la característica de una **idea fuerza**, que pronto va a perder lo que pudiera haber tenido de precisión académica, para cubrir, bajo su manto, todo un multiforme conjunto de interpretaciones subjetivas e interesadas.

La **economía del bienestar** aparece todavía con la frescura de lo nuevo y hasta de lo novedoso, y hasta alcanzar, para muchos, la categoría de un **derecho natural**, de algo que le es debido al hombre por parte de la sociedad y, sobre todo, por la organización política de la misma. En tal sentido, puede aparecer como la antítesis de la **economía de mercado**, tomando el relevo al sueño fracasado de una **economía socialista**, cuyo paradigma era la consecución de una sociedad sin clases y absolutamente igualitaria.

Discurrir, aquí y ahora, sobre los problemas de la **economía del bienestar** es empresa ardua, que no puede ser abordada con todo el rigor necesario, pero que espero esbozar, al menos, para que cada cual pueda plantearse una reconsideración de su idea personal sobre la misma; y desentrañar algo de lo que se esconde en las batallas, tantas veces innobles, de los que utilizan tal expresión como arma arrojadiza.

No intentaré convencer a nadie de cual debe ser la acepción correcta, como paso previo a discurrir sobre la viabilidad y sostenibilidad del nuevo paradigma, sino que

* Conferencia pronunciada el 24 de marzo de 1999.

mi disertación quiere engarzar un conjunto de reflexiones que faciliten su contraste, permitiendo separar lo fundamental de lo accesorio, lo estructural de lo coyuntural, lo permanente de lo oportunista. El que nadie ose declararse contrario al logro de la **economía del bienestar**, como objetivo político central, no puede traducirse en que todos tengamos que rendir acatamiento a cualquier interpretación que quiera darse a lo que significa tal modelo.

El concepto al que nos enfrentamos no es unívoco, ya que al entrar en el lenguaje de la calle se ha cargado de subjetivismo, para transformarse en una idea proteica, capaz de recibir muy distintas interpretaciones personales.

EL PASADO

Cierto es que las «nuevas ideas» eclosionan muchas veces como las flores, en un momento y en unas condiciones determinadas del entorno. Toda flor tiene su antecedente en una semilla, a veces diminuta, que contiene en potencia todo su futuro esplendor. Cuando una idea se acuña en el campo científico toma también sustancias del pasado: los bien conocidos **antecedentes**.

Recuerdo, al respecto, la postura clásica de un ilustre ingeniero de minas español que, al recibir el encargo de redactar un informe técnico sobre las posibilidades de explotación minera de una determinada zona o criadero, inquiría siempre del demandante si debía o no remontarse al tiempo de los romanos, a efectos de complementar la investigación técnica requerida con otra de carácter histórico, que a veces resultaba tan esclarecedora (ni no más) que la primera.

No seguiré las huellas de tal proceder, pero ello no es óbice para dejar claramente sentado que el **bienestar económico** aparece como objetivo político antes incluso del nacimiento de la ciencia económica; aunque su formulación correcta haya de esperar a la aceptación plena de las tesis individualistas que fundamentan la **teoría del consumo**.

Hasta los manuales de historia suelen recoger algunas expresiones laudatorias para aquellos buenos gobernantes que mostraron claros signos de preocupación por el bienestar de sus pueblos y supieron obrar en su favor. Las nuevas corrientes historiográficas bucean en el esclarecimiento de cómo se desenvolvían las sociedades de las distintas épocas y periodos; buscando la superación a los viejos centones, organizados como meros recordatorios de fechas y lugares de las batallas más señaladas, sucesiones de monarcas y gobernantes, proclamación de leyes y edictos, entronques dinásticos, revoluciones y algaradas, independencias y vasallajes, descubrimientos y conquistas.

Sin embargo, cuanto más atrás se lleva la investigación se encuentra menos información fidedigna sobre lo esencial y profundo de las situaciones sociales frente a los distintos rastros de lo epidérmico, e incluso epitelial, del acontecer político. De todas formas hay una tendencia genealizada a tratar el **bienestar del pueblo** como una circunstancia aleatoria, que se da en determinados momentos y circunstancias y que se identifica, más bien, con la ausencia de situaciones del malestar endémico que pueden ir desde la inseguridad en la conservación de vidas y haciendas frente a terceros, a la sucesión de hambrunas cíclicas.

Pero el pueblo es algo así como el coro de las tragedias griegas: el eco que recoge, repite y amplifica los sentimientos de los personajes que cuentan al fin y a la postre. Los actores de la política tienden a confundir el bienestar de todos con el poder y la gloria de la nación; lo que constituye una grosera aproximación al tema cuando no es un error profundo en cuanto se fundamenta en el sacrificio del pueblo. Sólo cuando tal situación se hace insostenible y se producen motines, algaradas o revoluciones, aparece claramente que el esplendor de cortes y gobernantes se ha cimentado sobre el malestar del pueblo.

Por otra parte, los gobernantes tienden a asumir la tarea de definir el **nivel de bienestar** que debe corresponder al común de los mortales en una sociedad prácticamente petrificada, cuyos cambios son lentos y casi imperceptibles, al no superar el ámbito de un muy reducido número de venturas o desventuras individuales, que son la excepción en el devenir de sociedades estamentalizadas. Si nos referimos ya al **bienestar económico**, el buen gobernante estará satisfecho de asegurar, en condiciones normales, el **nivel tradicional de abastecimiento** de su pueblo, entendido globalmente; en modo alguno con carácter individual, por cuanto el individuo correrá su propia suerte, salvo la ayuda que en casos extremos pueden proporcionarle la caridad y la beneficencia.

Cuando ya en el siglo XIX la economía empieza a estructurarse como ciencia formalmente desligada del conjunto genérico de las ciencias morales, se produce un abandono del fin del **bienestar económico** como objetivo diferenciado dentro de la acción política. La economía clásica, en su formulación más independiente, acepta el principio de que el libre mercado asegura el óptimo social. Su formulación más rígida se alcanza con el **óptimo de Pareto**, que incorpora la **sublimación del individualismo** al establecer que cualquier cambio en las condiciones económicas preexistentes se alejará del óptimo en cuanto tenga un efecto negativo sobre alguno de los sujetos intervinientes.

No cabe duda que el **liberalismo económico** representó un golpe de muerte para el **viejo orden económico**, en cuanto éste tenía de **paternalismo social**. Se excedió en cuanto supuso la entronización del individuo como centro del quehacer económico y sujeto de la economía, desplazando la vieja consideración mercantilista del Estado como sujeto principal. Basta, a este respecto, recordar el título de la obra capital de Adam Smith: **la riqueza de las naciones**.

En el nuevo paradigma es el hombre aislado el centro del universo económico, el **sujeto** por antonomasia. Habrá que esperar a la lenta crisis del **sistema capitalista** para que se produzcan sucesivas revisiones de sus más firmes principios de carácter fatalista, como la **ley de bronce del salario**, o los que Malthus quería obviar con un **control de la natalidad** basado en principios morales, retomando la economía al viejo tronco de donde saliera.

El hombre recupera su carácter de ser social, sin abdicar de su individualismo, y la política económica empieza a ponerse al servicio de la sociedad y no sólo del Estado. Los adelantos de la ciencia estadística facilitan la medida en términos cuantitativos, de lo que hasta entonces era poco más que un sentimiento difuso, sacudido cíclicamente por crisis de insatisfacción generalizada, que solían llevar a situaciones extremas de inestabilidad política o de revueltas sociales.

Por diferentes caminos (incluso revolucionarios) se manifiesta una preocupación creciente por la perecuación **sociedad-bienestar** en el campo de lo material, fuera de la forzada **economía de la continencia**, característica de siglos anteriores. El **bienestar económico** no se limita ya a la ausencia de carencias que afectan a la propia supervivencia, sino que puede medirse en función de los bienes económicos a disposición de la sociedad.

Aparece así una consideración monista del **bienestar económico**, que trata de medirle a través de la renta y su distribución personal, aun cuando ésta última no logre superar, en ocasiones, la consideración referente a distintos grupos sociales, como una aproximación más fácilmente alcanzable. En segundo lugar, la economía (como ciencia y como política) se concibe como un instrumento necesario para el **bienestar social** o general, del que el **bienestar económico** se considera como una parte del mismo. Desde luego una parte fundamental, al menos en la sociedades occidentales.

La distribución de la renta entre los distintos sectores de población se presenta, pues, como el punto crucial del problema, cuya resolución se enfrenta a dos tipos de soluciones. El primero pone el énfasis en el carácter autoritario de la distribución, sustrayéndola a los automatismos del mercado; éste es, en líneas generales, el planteamiento del socialismo marxista que culminará en la aparición de las **economías centralizadas**, hijas de la revolución rusa de 1917. El segundo salva el **mercado** como eje central del acontecer económico y trata de modificar la distribución de la renta que se produciría automáticamente, actuando sobre los parámetros que rigen tal distribución.

LA ECONOMÍA DEL BIENESTAR COMO CIENCIA ECONÓMICA

Es la obra de **Pigou** titulado *Welfare Economics*, publicada en 1920, la que introduce formalmente el concepto de **economía del bienestar**. A partir de ahí la locución hace fortuna y se presta a múltiples disquisiciones, e incluso desviaciones, en relación al pensamiento original de **Pigou**.

Para éste, el mayor bienestar económico se afirmarfa en una sociedad que lograra el cumplimiento simultáneo de los tres condicionantes que se exponen a continuación:

- Una producción tan alta como sea posible.
- Una distribución tan igualitaria como sea posible.
- Una rectificación de producciones rentables que acarrear perjuicios a algunos grupos de ciudadanos.

Por lo tanto, el primer énfasis lo pone **Pigou** en la maximización de la **Renta Nacional**, de acuerdo con los medios a disposición de la actividad económica; lo que traslada el problema a su utilización plena y a la creación de nuevos medios y mejora de las condiciones productivas de los existentes. Se perfila aquí la **economía de pleno empleo**.

Será posteriormente **Keynes**, el que ponga de manifiesto el axioma de que **se produce para consumir**, y el papel que, por tanto, ejerce el sostenimiento de la

demanda efectiva en la consecución del primer objetivo pigouviano. Pero el modelo de **Keynes** es, ante todo, un modelo coyuntural, como reacción a la gran **Crisis Mundial** de los años 30, que se manifiesta, sobre todo, desde el lado de la demanda, con una situación que coexiste con la existencia de una importante **capacidad productiva ociosa**. El planteamiento de Pigou es más general, amplio y con connotaciones estructurales, en cuanto permite incluir actuaciones sobre los distintos medios de producción, y le entronca con los posteriores **modelos de desarrollo económico**.

Las revisiones posteriores no afectarán al principio de la maximización de la producción, sino al interrogante de si la **Renta Nacional**, con la metodología concreta para su obtención, ofrece una valoración correcta. Los últimos perfeccionamientos al respecto han señalado la importancia de incorporar estimaciones complementarias referidas a la **economía sumergida**, e incluso a reconsiderar el **bienestar económico** como una parte del **bienestar general**, añadiendo para la valoración de éste aspectos ligados a la ecología (produzca o no diseconomías) y al **tiempo de ocio** (en contraposición al de trabajo).

Los interrogantes que surgen en primer lugar se pueden sintetizar tal como sigue:

- No parece que el aumento de renta mejore siempre y automáticamente la distribución de la misma. Sin embargo no faltan quienes ponen el acento en dicho aumento, pensando que la distribución mejorará, cualquiera que sea el sentido con el que quiera entenderse tal mejora.
- Para muchos el objetivo de una distribución igualitaria de la renta no pasa de ser un sofisma, o, al menos, un apriorismo no científico.
- La corrección de ciertas producciones perjudiciales aparece como excesivamente simplista, aunque tiene el mérito de suponer un adelanto de las actuales preocupaciones ecológicas.

Respecto a la relación entre nivel de renta y su distribución, las posiciones extremas se pueden identificar por un lado, con la de **Pareto** para el que la distribución obedece a la correspondiente a la función:

$$N_x = A \cdot X^{-\alpha}$$

en la que N_x representa el número de sujetos (o familias) en renta igual o superior a X , mientras que A y α son dos parámetros a ajustar en cada caso, de los que α venía a tener (en su opinión) un valor próximo a 1,5 a los países occidentales. Por otro, con la que el **Banco Mundial** mantuviera a principios de los 60 en su **Informe sobre la Economía Española**, al no aceptar requerimientos de reequilibrio territorial de la renta, defendidos por nuestras autoridades, sosteniendo que la situación mejoraría, por sí sola, a lo largo de un proceso continuado de aumento de la renta nacional.

Para ambas posturas carecerían de sentido políticas de redistribución de la renta. En un caso, porque la «forma» de la distribución sería prácticamente permanente. En otro, porque no habría razón para actuar cuando el proceso buscado sería un mero corolario del desarrollo económico.

De aceptarse esta última posición cabría, sin embargo, formular una pregunta de gran calado práctico: ¿una distribución más igualitaria cómo afectaría al futuro crecimiento de la renta?

Sin tiempo para profundizar suficientemente en el tema, baste señalar que se trataría de discurrir sobre las relaciones entre tres principios distintos, que podrían informar, distintas políticas de redistribución de la renta. Estos son los de **justicia, equidad y eficiencia**.

Para muchos, el principio de **justicia** lleva necesariamente al de **igualdad**, expresión que entronca con la más clásica de las utopías socialistas. No es casual que a partir de 1995 la **Fundación Argentaria** empezara a publicar con periodicidad mensual y bajo el título de **IGUALDAD** un Boletín Informativo del Programa de Estudios sobre Igualdad y Distribución de la Renta y la Riqueza, al tiempo que desarrollaba, con igual título, todo un programa de publicaciones y patrocinaba la celebración de varios Simposios.

Otros, por el contrario, opinan que la **igualdad** se pone a la **equidad**, es decir, al principio que defiende una relación más estrecha entre la distribución del producto social entre los distintos agentes económicos en razón a su participación efectiva en la obtención del producto; así como en el principio racional de que sería finalmente injusto tratar como iguales a quienes por naturaleza, formación y esfuerzo son claramente desiguales.

Los más preocupados porque los **niveles de bienestar** puedan crecer en el futuro, opinan que el aumento en el tamaño de la «tarta» mejorará, sin duda, los efectos positivos de cualquier política de redistribución. Bajo tal premisa, debe ponerse también atención en cómo determinadas políticas redistributivas pueden afectar (positiva o negativamente) a la **eficiencia** del sistema económico; es decir, a aumentar, más o menos rápidamente el «tamaño de la tarta».

LOS FUNDAMENTOS PSICOLÓGICOS Y SOCIOLÓGICOS DEL BIENESTAR

La más orrecta **teoría del consumo** se fundamenta, sin duda alguna, sobre el concepto económico de **utilidad de un bien** como «su capacidad en orden a la satisfacción de las necesidades» y esta »forma de relación» entre bienes y necesidades expresa una valoración profundamente psicológica, ejercitada por el **consumidor individual**. Pero si la teoría económica parte, en este campo, de la consideración de **funciones de utilidad individual**, los planteamientos macroeconómicos suelen hacer uso (y aun abuso) de un concepto más complejo y más difícilmente aprehensible, salvo simplificaciones que, muchas veces, le vacían en buena parte de contenido: la **función de utilidad social**.

Es bien sabido que no existe unidad objetiva de medida para estimar la **utilidad individual**, y que, por lo tanto, la **función de utilidad social** no puede obtenerse como suma o integración de utilidades individuales. Igual ocurre si se cambia **utilidad** por **satisfacción**, entendiendo ésta última como una valoración «a posteriori» del acto de consumo, que, en puridad, podría estimarse como más afín al concepto de **bienestar**.

En el tránsito de la **utilidad individual** a la **utilidad social**, en búsqueda de una regla adecuada para la prosecución del **óptimo social**, la posición más respetuosa con la libertad individual es la recogida en la **revisión paretiana del óptimo social**, que le identifica como aquella posición de los sujetos económicos para la cual cualquier modificación supondría perjuicio (menor utilidad) para, al menos, uno de los mismos. Pero tal concepción no asegura la unicidad del óptimo social, porque, como bien expone la **teoría del cambio económico**, la posición final «inamovible» (bajo el principio del **Pareto**) puede ser diferente según el «camino» por el cual la misma ha sido lograda.

Las alternativas a lo poco fructífero del planteamiento de **Pareto** desde el punto de vista de la **economía social** son:

- Utilización de **funciones de utilidad social** análogas a las individuales «normales», en cuanto a la forma, como mero instrumento explicativo.
- Llegar, a través de procesos más o menos identificados, a utilizar la renta como un «estimador válido» de la **utilidad social**.
- Entender que los gobiernos están capacitados para interpretar el concepto de **utilidad social**, decidiendo apriorísticamente, o en cada caso, lo que conviene a la sociedad. Ya sea bajo la forma de **despotismo ilustrado**, de **socialismo real**, o de mero **intervencionismo económico**, el sistema puede funcionar, en tanto en cuanto la sociedad se adhiera, acepte o aguante cualquiera de estos «planteamientos dirigistas».

La «solución paretiana» no puede entrar a juzgar sobre el nivel de bienestar de la situación de equilibrio. La «solución autoritaria» se basa en juicios de valor de los rectores de la economía y en la subordinación de tales juicios a objetivos políticos, que resultan en buena parte extraeconómicos. La primera puede llevar a situaciones de penuria de servicios sociales en medio de una sociedad opulenta, como algunos apuntan en el caso de Estados Unidos. La segunda puede llevar a la sociedad a carecer de futuro a largo plazo (caso de las economías centralizadas), o a situaciones esquizoides (caso de Cuba).

Aunque se mantenga incólume el atractivo ofrecido por la locución **economía del bienestar**, pocos conceptos han atraído más la atención de los estudiosos y más han sido objeto de sucesivas revisiones e interpretaciones. La mayor parte de ellas han profundizado en el hecho de que el **bienestar económico** es tan sólo una parte del **bienestar general**, aunque para muchos sea la más importante.

Como ya hemos indicado con anterioridad, la valoración más restrictiva vendría dada por el **nivel de renta** como indicador del **nivel de vida**, con la conveniente inclusión, en la valoración de la Renta, del porcentaje estimado para la incorporación de la **economía sumergida**, como ya se apunta en muchos países. De esta primera y burda aproximación se pasaría a añadir un concepto adicional (o totalizador) que no es otro que el de la **calidad de vida**, difícilmente cuantificable, sobre todo respecto a la **utilidad** (o **satisfacción**) derivada de los aspectos medioambientales, ya sean estos de carácter físico o de carácter social. Por su parte la valoración del **ocio** plantea otro tipo de problemas

Aunque no faltan los trabajos al respecto, sigue sin lograrse una correcta **integración económica-ecológica**. Las posiciones extremas (y por tanto inaceptables) se encontrarían en el postulado decimonónico de que el deterioro medioambiental (de cualquier tipo) es un «peaje» que es preciso pagar en todo proceso de desarrollo; en el objetivo de parar todo proceso de desarrollo aunque sea mínimamente contaminante (**crecimiento cero**, según el ya desprestigiado **Club de Roma**); o en la recuperación de una naturaleza preexistente o idealizada y una sociedad venturosa o desgraciadamente fenecida (como postulan ecologistas radicales y utopistas de muy distinta condición).

Por ello, parece mucho más fructífero y prometedor abandonar la senda que, en todo caso, nos llevaría al difícil y traicionero campo de la macroeconomía cuantitativa (no simplemente expositiva), para transitar las diferentes «vías de actuación» con que la humanidad, en sus diversas épocas, ha tanteado alcanzar ese horizonte intuido del **bienestar económico**. Y si es posible (por razones de tiempo y lugar) no faltarán algunas disgresiones complementarias enfocadas hacia el **bienestar social**, especialmente en los aspectos más ligados al campo de la economía.

LUCHA CONTRA LA POBREZA

Ciñiéndonos al ámbito de la civilización occidental, no ofrece duda la aseveración de que la primera piedra en el camino hacia el **bienestar económico**, a nivel social, se encuentra en la **lucha contra la pobreza**, hasta el punto de que tal objetivo es, para muchos, la «piedra angular» del edificio de cualquier política práctica, cuyo objetivo sea el logro de un mayor **bienestar económico**. Mucho antes de que se acuñara el término **filantropía**, la existencia (y sobre todo la persistencia) de la pobreza era entendida como un mal social, combatible bajo la óptica de tres principios distintos: **caridad, beneficencia y solidaridad**.

La **caridad** es, ante todo, en la civilización cristiana, una de las tres virtudes teológicas. En el orden que suelen exponerse es la tercera y última; pero también es la única que incorpora, naturalmente, acciones volitivas para su ejercicio. La **fe** es un don del espíritu (se tiene o no se tiene); la **esperanza**, un estado de ánimo (poder alcanzar lo que deseamos); la **caridad**, un auxilio, que se presta a las necesidades (no la simple conmiseración de una situación).

La **caridad** ha sido ejercida tradicionalmente por la Iglesia (o las iglesias, para ser más preciso), pero no sólo por sus organizaciones, sino también directa e individualmente por sus fieles. Yo he alcanzado a vivir en una sociedad tradicional en que las familias más conspicuas (aunque no siempre las más ricas) tenían sus propios pobres, que solían acudir juntos, una vez a la semana, a recibir la correspondiente «caridad».

Mi experiencia personal se centra, sobre todo, en el ámbito rural y resulta curioso el hecho de que, en general, eran los propios «pobres» los que elegían la familia protectora y cuidaban, entre todos, que no se colaran intrusos. Desde generaciones anteriores, la costumbre había hecho nacer un «derecho», que se ejercía con modestia (aunque no siempre) por ambas partes y que era objeto de transmisión hereditaria, si no se producían cambios de fortuna; y aun parece que, en ocasiones, podía ser objeto de compraventa.

Junto a la **caridad** apareció luego la **beneficencia**, sin que se diferenciaron claramente las fronteras entre una y otra; hasta el punto de que muchos «establecimientos benéficos» se identificaban como «hospitales o asilos de caridad». La diferenciación debería buscarse bien en el mayor nivel de organización de las acciones filantrópicas mediante el establecimiento por particulares de **fundaciones benéficas** (con personalidad jurídica propia), o por las actuaciones llevadas a cabo por los poderes públicos con el objetivo de asistir a los menesterosos.

Tan sutil es la diferencia con la **caridad** que el menesteroso que recogía la «sopa boba» a la puerta de un convento, es difícil que la distinguiera de la que pudiera recibir a la puerta de un cuartel.

El más importante hito histórico (aunque, por otra parte, muy peculiar) de la **lucha contra la pobreza**, por parte de los poderes públicos, se encuentra en las anglosajones **leyes de pobres**, que imponían a los municipios la carga del mantenimiento de quienes no podían hacer frente a su propia subsistencia a través del trabajo (niños, enfermos, ancianos, etc.) y tampoco se beneficiaban de la solidaridad de grupos sociales inferiores como la familia y la parroquia.

Caridad y beneficencia, aparecen hoy ampliamente repudiadas como «conceptos», por lo que tienen de unilateralidad y de actitud voluntarista expresiva de la «bondad» de quienes ayudan a los pobres. Aparece primero el concepto de justicia social, bajo el que intenta construirse el «derecho de los pobres» a recibir ayuda de la sociedad y de los poderes públicos, con carácter imperativo. Incluso algunos moralistas católicos (ver, por ejemplo, la obra del padre Azpiazu S.J. titulada *Moral Profesional Católica*), llegan a defender la fijación de la cuantía de las limosnas que debe dar el «buen creyente», en función del nivel de sus ingresos. No son ya los «diezmos y primicias» para el sostenimiento de la Iglesia; se trata de una tabla marcando una escala progresiva, al modo como luego se generalizaría para el impuesto sobre la renta.

Actualmente pocos hablan de la **caridad**, porque su raíz religiosa molesta, sin duda, a la «progresía» rampante. A la sociedad actual le desagrada la tradición de la beneficencia pública y la vetustez de sus métodos e instalaciones. Todos (incluso muchos clérigos) se acogen al vocablo **solidaridad**, sin que muchos conozcan ni su esencia real ni su alcance. Este último se ha traducido finalmente en el famoso **07 por ciento**, que ha llegado a aplicarse como elemento de marketing en la venta de variados productos y servicios.

De todas formas, cualquiera que sea el concepto de **solidaridad** que se considere, y puesto que **caridad y beneficencia** no son sino formas de manifestar la **solidaridad social**, el primer problema a resolver es elucidar el concepto de **pobreza**.

En el momento actual se está lejos de identificar la **pobreza** con su acepción más estricta de «carencia de lo necesario para el sustento de la vida», aunque esta definición se mantenga firmemente anclada en el subconsciente personal y se aplique al actual concepto de **pobreza**, que es siempre relativo, cuando se intenta su cuantificación; y subjetivo cuando se pretende marcar la **línea de la pobreza**. En el primer aspecto queda ligado a la distribución personal de la renta; en el segundo, a la estimación del nivel relativo mínimamente aceptable respecto a la renta media, llegando a distinguir entre **pobreza absoluta** y **pobreza relativa**, mediante la introducción de un nuevo

apriorismo tal como el de estimar cuál debe ser el nivel de renta correspondiente a un **nivel de vida digno**.

Esta falta de armonía entre la estimación puramente estadística de la pobreza y su valoración subconsciente puede verse, año tras año, cuando organizaciones como Cáritas (e incluso organismos internacionales) publican sus cifras al respecto. Las mismas sirven de apoyatura a la emisión de **juicios de valor**, para criticar una **política económica** concreta, calificar de profundamente injusto un **sistema económico**, o proclamar la necesidad de subvertir el **orden social** existente y destruir el **orden moral** prevaleciente.

La experiencia histórica es absolutamente concluyente respecto a que la **pobreza** ha acompañado permanentemente a las sociedades humanas. Estas han evolucionado, hasta el presente, permitiendo, en todo caso, reducir su extensión y sus efectos. El **Estado de Bienestar** dispone de armas adecuadas para combatir la **pobreza**, pero pensar en su erradicación no pasa de ser una utopía, un horizonte perseguible pero no alcanzable.

Históricamente se ofrecen situaciones de **pobreza cíclica**; es decir de ciclos de pobreza derivados de causas naturales o de factores concretos (en especial, las guerras). Esas hambrunas que hoy aparecen en países del «Tercer Mundo» y de cuyos efectos hay quienes insisten en culpar a los países más avanzados (los del «Primer Mundo»), ignorando, o pretendiendo ignorar, que también campearan repetidamente por las tierras de la vieja Europa, hasta el siglo pasado, provocando millones de muertes. Entre nosotros y en el presente siglo, aún somos muchos los que recordamos como «años del hambre» los primeros años 40 de nuestra postguerra.

Por otra parte, y dado el carácter relativo de la **pobreza**, siempre existirán **bolsas de pobreza**, incluso en economías globalmente adelantadas, agrupando (por definición) sectores sociales o territorios cuyo **nivel de vida** no supere unos límites predefinidos. Este se medirá generalmente en términos de renta personal, familiar o renta media territorial según los casos; pero también se intenta, en ocasiones, definir el **área de la pobreza** a partir de consideraciones subjetivas sobre el mínimo tolerable en la **calidad de vida**.

Este último concepto es mucho menos cuantificable y refleja «modelos de vida» que no son consustanciales con los grupos sociales o las áreas territoriales calificadas como «pobres». Se trata, en unos casos, de grupos étnicos diferenciados, o de grupos sociales marginales, cuya escala de valores (por ejemplo, respecto a la vivienda) difiere de la comúnmente aceptada por la mayoría. En otros, se trata de territorios retrasados en los procesos de evolución socioeconómica general, por su condición de relativo aislamiento y de una estructura social petrificada (por ejemplo, valles cerrados), o por causa de profundas crisis económicas de carácter estructural (por ejemplo, los viejos territorios mineros o de concentración de industria pesada hoy obsoleta).

Lo que no cabe duda es que la primera preocupación del **Estado de Bienestar** es la lucha contra las **bolsas de pobreza** de uno y otro tipo. Los políticos y los agitadores sociales, que tan dados son a las palabras grandilocuentes, suelen proclamar como objetivo la **erradicación de la pobreza**, lo que no pasa de ser una utopía inalcanzable, tanto porque la medición de la pobreza se hace siempre en términos relativos, como

porque hay personas y grupos sociales que, temporal o permanentemente, se sienten «cómodamente asentados» en **formas de vida** que el conjunto de la sociedad califica sin duda de insatisfactorias. Basta recordar a las familias que habitan en chabolas (favelas, ranchitos, bidonvilles, etc.) inseguras e insalubres, pero al mismo tiempo pueden disponer de todos los electrodomésticos al uso y de automóvil privado. En el extremo estarían los vagabundos («sin techo», clochards, homeless, etc.) que prefieren dormir en la calle que en un albergue de caridad, salvo en situaciones extremas.

No es de hoy el pensamiento de que siempre ha habido y siempre habrá una variada y proteica **comunidad de los pobres**, con sus problemas específicos y sus cambiantes singularidades, que permiten diferenciar (y no sólo en el tiempo) a los que integraban «la Corte de los Milagros», de los que retratará Dickens al principio de la revolución industrial, de los «parias» enquistados en las distintas civilizaciones, e incluso de ciertas «comunidades de okupas» más o menos auténticas. Esto es así; se admita o no el pensamiento calvinista de que, en la mayor parte de los casos, los pobres lo son »porque se lo merecen»; es decir porque no se adaptan al engranaje socioeconómico general.

Ello nos lleva a afirmar, con rotundidad, que el logro de un **Estado de Bienestar** requiere asentarse en una **economía del bienestar**, pero ésta no es suficiente para que la sociedad alcance niveles de bienestar satisfactorios en aquellos aspectos que desbordan el ámbito de lo económico.

El mayor fracaso que puede alcanzarse en la **lucha contra la pobreza** es que no pueda romperse la estructura de la **comunidad de los pobres**, y que tal comunidad, en vez de integrarse, en cada momento, por grupos y personas coyunturalmente desfavorecidas, éstos y éstas sean siempre los mismos, perpetuándose generacionalmente por «razones» étnicas, culturales, de salud, etc. Evitarlo supone la correcta aplicación del **principio de igualdad de oportunidades**, como medio necesario, pero no suficiente, para no caer en el anquilosamiento de las **estructuras sociales**. No se trata de imponer una utópica igualdad socializante, sino de reducir al máximo la marginación de los menos favorecidos, incluso de aquellos grupos e individuos que gustan de «automarginarse».

La posible marginación por causa de infortunios sobrevenidos tenía más fácil corrección cuando predominaban (y funcionaban) los grupos familiares amplios, que acogían o ayudaban, de una u otra forma a los «parientes pobres». La evolución de la dimensión familiar, que ha llevado esta institución a la «familia nuclear», e incluso a la monoparental, y la reticencia de unos y otros frente a la **caridad** y la **beneficencia**, ha arrojado sobre el Estado la carga principal de luchar contra la pobreza. La sociedad que asiste despreocupada (y hasta gozosa) a la «voladura controlada» de la institución familiar, exige del Estado lo que debería resolverse a menor escala y de modo directo. Han subrogado a éste en el cuidado de los «viejos» abandonados por su «prole».

Y el Estado, que forzosamente ha de objetivar el tratamiento de la **pobreza**, tiene que medir ésta, primariamente, en términos de renta, e insertarla en las políticas de redistribución de la misma como meta de un proceso que ha llevado a proponer medidas tales como la **renta mínima garantizada**, y a acuñar conceptos tan curiosos como el de **salario social de integración** (o análogos), que nada tienen que ver con la contraprestación a recibir a cambio de un determinado trabajo.

Pese a las propuestas de algunos economistas teóricos, el **Estado de Bienestar** no ha entrado en los modelos, preconizados por los mismos, de actuación directa sobre la **renta monetaria**, modificando, mediante un juego de impuestos y subvenciones personales, la distribución del ingreso resultante del mercado. Propuestas como la de **Milton Friedman** y su **cheque-ingreso**, o como el **impuesto negativo sobre la renta** simplifican absurdamente el tema de la redistribución y no entran en la consideración de los incentivos sociales y las desincentivaciones económicas que los mismos llevan aparejados.

Las **políticas de bienestar** no pueden aplicarse uniformemente a cualquier sociedad, y en cualquier tiempo, sin temor al fracaso. Reducir la **pobreza** se facilita si el pobre está dispuesto a ciertos sacrificios para dejar de serlo (esfuerzo de trabajo, aceptación del orden social, mayor disciplina, etc.). Aun cuando puede tildarse de «moralmente reprobable», y desde luego de «políticamente incorrecto», no cabe duda que las sociedades (como las anglosajonas) que imponen un cierto estigma sobre el marginado (de acuerdo con las tesis calvinistas) reaccionan mejor a los programas de **lucha contra la pobreza** que aquellas otras (como las latinas) en que el beneficiario tiende a asentarse permanentemente en una sociedad, crecientemente ineficiente, que exige todo al **Estado-Providencia**.

Nada tienen que ver tales beneficiarios con la clase de los **pobres vergonzantes**, típicos en la sociedad española en buena parte de los dos últimos siglos. Tan ilustre y literaria clase se nutría, básicamente, de los miembros de familias de clase media en las que, al morir el padre o el marido, éste «se había llevado consigo la llave de la despensa». No siempre se lograba la solución correcta de que pudieran recibir la ayuda de una caridad en la que no se corriera el peligro de ser tomada como ofensa.

En el extremo opuesto a este arquetipo se sitúan los «pobres profesionales», que han hecho de su condición (real o ficticia) una profesión remunerada y que hoy nos conminan en cualquier semáforo a la entrega de una limosna, cuya cuantía la establecen «a priori». Junto a ellos están los más sofisticados defraudadores y «vivillos» que abusan (sin justo derecho y necesidad) de los frutos proporcionados por los **sistemas de protección social** a los que logran acogerse (paro, empleo rural, bajas por enfermedad, incapacidad, etc.). Estos gozan incluso de un cierto «aprecio social» en sus vínculos más próximos que ensalzan (y envidian) sus habilidades.

Son éstos últimos los que en mayor medida atentan contra el futuro de la **economía del bienestar**, sobre el que volveremos en una reconsideración final.

ASISTENCIA Y SERVICIOS SOCIALES

Al tratar de la **lucha contra la pobreza**, como primer objetivo de la **economía del bienestar**, se ha prestado, sin duda, mayor atención a los aspectos conceptuales que a los medios utilizados en las correspondientes políticas practicadas con tal fin. Tras el antecedente de la **beneficencia pública** tradicional, el nacimiento de una nueva **política social** suele fijarse en la creación por **Bismarck** de los primeros **seguros sociales**, que empezaron con la concesión de pensiones por enfermedad a los trabajadores industriales en las épocas en que por dicha circunstancia, no podían trabajar y obtener los correspondientes ingresos.

El objetivo perseguido por **Bismarck** no era otro que el de fortalecer la **paz social** en una época en que las tesis y las profecías marxistas sobre la inevitable revolución y la crisis final del capitalismo, recorrían Europa. La **seguridad social** nace bajo la técnica del seguro personal, en que se adquiere un derecho como contraprestación aleatoria al pago de las correspondientes «primas». Lo que la diferencia de los demás seguros al uso es que se establece su **obligatoriedad** y las primas se cubren mediante **detracciones previas** impuestas sobre los salarios y **contribuciones de los empleadores** que complementan las soportadas por los trabajadores.

Por el contrario, la **asistencia social** no nace como **derecho** sino como **donación** establecida graciosamente, a favor de personas y grupos desfavorecidos, en base a un ejercicio reglado del **principio de solidaridad**. **Seguridad** y **asistencia** se concretan en un variado conjunto de **servicios sociales**, a lo largo de un proceso que ha ido debilitando el concepto de **asistencia social** frente a la generalización del de **seguridad social**, repitiendo la experiencia vivida por la clásica **beneficencia pública**.

Lo que en la **asistencia social** empezó siendo un incentivo para facilitar el logro de ciertos objetivos sociales como la nupcialidad, la natalidad, o las familias numerosas, fue evolucionando hacia la concesión de ayudas diferenciadas para determinadas situaciones (orfandad, vejez, estudios, madres solteras, etc.). Este proceso se vio facilitado por la existencia de superávits financieros, en los primeros tiempos, de una **seguridad social** no regida por el sistema de **capitalización y reservas técnicas**, sino de **reparto**, y en la que los obligados cotizantes superaban ampliamente a los posibles beneficiarios.

La historia de la **seguridad social** española es absolutamente esclarecedora al respecto. Las cotizaciones hubieron de ser crecientemente complementadas por el Estado, en base a los rendimientos del sistema impositivo general y la frontera diferenciadora con la asistencia social se fue desvaneciendo en el paso del primitivo SOE (seguro obligatorio de enfermedad) a la generalización de la Seguridad Social (en tiempos del Gobierno del PSOE) con la implantación de conceptos tales como las **pensiones no contributivas**, o el **salario de integración**, del que ya hemos hecho mención.

Se convirtieron así en derechos exigibles (y exigidos con vigor) **servicios sociales** que siguen siendo esencialmente justificables bajo el **principio de solidaridad** y posibles tan sólo en **economías desarrolladas**. La **equidad**, la **eficiencia**, e incluso la **justicia** han cedido el paso a la entronización de la **igualdad**, hacia la que se camina tratando por igual a **cotizantes** y **no cotizantes**, cerrando progresivamente el abanico de las pensiones, entre el mínimo de las **no contributivas** y el máximo de aquellas para las que se establece un «tope» irrebable, desligados ambas de toda relación objetiva con las correspondientes cotizaciones.

La **economía monetaria**, bajo cuya óptica se discuten los problemas de los **servicios sociales**, ha hecho caer su espeso velo sobre las duras aristas de la **economía real** y difícilmente se toman en consideración principios de **equidad** y mucho menos de **eficiencia**. Por ejemplo, frente al antiguo principio de que las **becas de estudio** trataban de que no se perdieran «inteligencias privilegiadas», o cuando menos «sobresalientes», son hoy muchos los que defienden que al alumno becario no debe exigírsele más que a un «alumno mediano».

Mantener una cierta diferenciación sobre qué servicios deben entenderse básicamente como correspondientes a la **asistencia social** permite ajustarlos mejor a las exigencias de la **solidaridad** y evitar, con mayor facilidad, su degeneración o tergiversación; o al menos reducirlas. La primera consideración al respecto, se centra en la discusión de si la **asistencia social** debe incidir en el beneficiario en términos de **renta monetaria** (en dinero), o si es preferible, en ciertos servicios, que la prestación se haga «en especie».

Para los más puristas defensores de la **economía individualista**, todas aquellas percepciones que no se reciban en dinero (o no puedan monetarizarse fácilmente) hacen que el receptor no pueda maximizar la **utilidad individual** obtenible de su consumo, al no poder actuar libremente como **sujeto económico**, puesto que se le imponen determinados consumos. Quienes así piensan contemplan subconscientemente la **utilidad social** como suma de **utilidades individuales**. El máximo de la primera se corresponde con los máximos de los segundos (al menos en el sentido paretiano).

En aquellas economías más avanzadas (como la de Estados Unidos) y donde los **estudios sobre la pobreza** se han desarrollado con mayor profusión y profundidad, no repugna que, en determinadas circunstancias y para determinados servicios, el individuo que, de una u otra forma, está integrado en la **comunidad de los pobres**, no resulta el más capacitado para seguir libremente las sendas marcadas por la **teoría de la elección**. Son grandes las posibilidades de que yerre al estimar la utilidad relativa de unos u otros consumos alternativos y que las divergencias finales entre **utilidad** y **satisfacción** globales sean mucho más amplias que las del **consumidor medio**. El servicio social **en especie** responde no a la valoración de un sujeto económico concreto, sino a la suplantación que la sociedad hace, sustituyendo la **preferencia individual** por una **preferencia socialmente establecida**.

Es la traducción a un lenguaje economicista del viejo consejo que el pobre podía recibir al aceptar una limosna (por vía de la caridad): «y ahora no se la gaste Ud. en vino». Se admite, en definitiva, que sólo parcialmente el beneficiario de **asistencia social** no pueda actuar como **sujeto económico pleno**. Pero en el modelo del socialismo real, esta preocupación no existe, puesto que el Estado es, en puridad, el único **sujeto económico**.

En las actuales **economías del bienestar**, el cuadro general de los **servicios sociales** ha rebasado los antiguos límites de la **beneficiencia pública**, por la que se atendía únicamente a los «menesterosos» y muy especialmente en el campo de la salud, con organizaciones tan curiosas como la llamada «la gota de leche», o a través de visitas médicas como las que llevaban a cabo los facultativos que integraban el Cuerpo Nacional de Asistencia Pública Domiciliaria (APD). Y como piezas esenciales: los hospitales públicos, asilos, orfanatos, etc.

Lo que caracteriza el nuevo escenario es la práctica extensión a toda la población de los **servicios médicos gratuitos** (total o parcialmente), financiados por los Presupuestos de la Seguridad Social, y el que tales servicios hayan dejado de ser una **liberalidad** de los poderes públicos para ser un **derecho** ejercitado por los ciudadanos. Ello conlleva (sobre todo en las sociedades latinas) a todo un conjunto de problemas, que van desde la masificación y la despersonalización, con que tales servicios se ponen al alcance de la población, a la aparición de abusos por parte de los beneficiarios.

Tales posibles abusos son de muy diversa índole y pueden ir desde la reiteración en la utilización de las consultas médicas (a veces por matar el tiempo) a la presión ejercida para obtener bajas laborales escasamente justificables, o certificados de invalidez, al despilfarro de productos farmacéuticos, utilización de las cartillas de familiares jubilados para reducir el coste de las medicinas, «aparcamiento» de los familiares ancianos en las urgencias de los hospitales en periodos de vacaciones, etc. Si ponemos atención en tales prácticas «picarescas» es en razón a exponer algunas de las raíces sobre las que se fundamentan situaciones de creciente inestabilidad financiera a las que se enfrentan los actuales **sistemas de seguridad social**.

No sólo desde el lado de la demanda, sino también del de la oferta, los **servicios sociales** requieren una permanente atención sobre el uso real de los mismos y sobre la eficiencia del propio sistema. El primero tropezará con la impopularidad de cualquier tipo de vigilancia e inspección, la segunda chocará, en ocasiones, con posiciones dogmáticas opuestas a sistemas de cooperación o concertación de la sanidad privada con la pública. Uno y otro aspecto son motivo de propuestas de racionalización, que van desde el «cheque médico» a la mayor participación del enfermo en costear las medicinas que adquiere, al impulso dado a la dispensación de «fármacos genéricos», al mejor ajuste entre el número de las unidades farmacéuticas dispensadas y las necesidades reales del paciente, o entre otras varias, a la reforma de los sistemas de gestión de las instalaciones hospitalarias.

El segundo de los grandes **servicios sociales** definitorios de una sociedad que camina hacia la consecución de un **Estado de Bienestar**, es la generalización de la **enseñanza pública** a todos los grupos sociales. El proceso seguido al respecto es muy parecido al antes apuntado con referencia a los **servicios médicos**.

Puede afirmarse que, sólo en épocas recientes, la **educación** es entendida como un **derecho** general de los ciudadanos, cuyo ejercicio real supone su estructuración como un **servicio social** «ad hoc», superando, con su generalización, los «primitivos planteamientos» elitistas, sólo asequibles a las clases superiores, o su carácter de «beneficencia espiritual» de las viejas escuelas parroquiales o conventuales y de los «estudios superiores» nacidos al calor de algunas catedrales. Es más tarde cuando se afirma su concepto de **servicio público**, aunque (en el caso español) sean los municipios los que hayan de tomar a su cargo el coste de su facilitación a quienes no puedan (o no quieran) acceder a la **enseñanza privada**.

La heterogeneidad de las condiciones materiales y formativas en que se imparte la enseñanza pública de unos a otros municipios y las crecientes corrientes de secularización acabaron llevando a que el Estado asuma la dispensación de este servicio, bajo el «banderín de enganche» de la **escuela pública y gratuita**. Nacen así las **escuelas nacionales**, a veces enfrentadas a las **escuelas de pago** en términos de estimación social.

No ha de extrañar que, al confluir este proceso con el nacimiento formal del **Estado de bienestar**, el modelo educativo se enfrente a dilemas de fondo, tales como la imposible (pero tantas veces pretendida) supresión de toda **enseñanza privada**, las posibles restricciones a la existencia o al funcionamiento de las «escuelas confesionales», o las formas de coordinación, cooperación o subordinación entre **enseñanza pública y enseñanza privada**.

Desde antaño, quienes buscan provocar cambios profundos a la sociedad han centrado su esfuerzo en la utilización de la **enseñanza** como el medio más idóneo para el «rpto de cerebros en formación», o en afirmar tal hecho cuando sus resultados se estiman contrarios a sus propios modelos de sociedad. Entre nosotros nadie presume de «progre», sin abominar de la formación religiosa y moral que recibieron en los colegios de frailes o de monjas. En la Polonia recién salida de la II Guerra Mundial sólo se permitió el acceso a la Universidad a los hijos de los trabajadores (a ser posible revolucionarios), negando a las clases medias y superiores (y sobre todo a los intelectuales) el derecho a reproducirse a través de la educación superior de sus hijos; en base a los efectos que sobre la concentración progresiva del poder y la riqueza eran denunciados por algunos ilustres teóricos de la economía (incluso no marxistas, como el italiano **Francesco Vito**)

Lo más curioso de esta singular disposición polaca es que la misma hubo de ser derogada en la generación siguiente, ante la encendida protesta de los «viejos revolucionarios» que veían vedado el acceso de sus nietos a la Universidad, porque sus hijos eran ahora considerados como integrantes de la nueva «clase intelectual».

Si hemos profundizado algo en la exposición de la medicina y de la enseñanza como **servicios sociales**, la razón no es otra que afirmar que una **economía del bienestar** no puede hoy en día identificarse con un simple **modelo de redistribución de la renta**, que se aproxime, lo más posible, a una distribución igualitaria, tal como preconizara **Pigou**. Hoy el **Estado de bienestar** se asienta sobre la extensión, generalidad e idoneidad de un conjunto complejo de servicios sociales:

Entre éstos debe considerarse (junto a muchos otros) servicios tales como:

- La prevención y seguridad en el trabajo.
- La atención e integración de minusválidos.
- La atención a los ancianos (o a la más amplia «tercera edad»).
- La promoción educativa y formación profesional permanente.
- La atención personalizada a grupos o personas necesitadas.

Todos ellos plantearán problemas de organización, pero también problemas agudos de financiación en la mayor parte de los casos, descubriendo ciertos flancos débiles, o ciertas soluciones singulares, en el conjunto de la **asistencia social** (o de la misma **seguridad social**).

En el escenario español, la **prevención y seguridad en el trabajo** lleva a progresivas cotas de intervención, complicación organizativa y elevación de los costes de producción, a través de formas diversas, tales como los **proyectos de seguridad** en el campo de la construcción, la proliferación de inspectores y comités «ad hoc» y la picaresca de muchos «accidentes menores» que se explotan (e incluso se provocan) para acceder al cobro de unas prestaciones monetarias compensatorias, al disfrute pagado de una **baja laboral**, o al premio de una **minusvalía**.

La **atención e integración de minusválidos** comprende tanto la percepción de pensiones (nacen precisamente en occidente con las pensiones de guerra), como el acceso a jubilaciones anticipadas y las ayudas a empresas para su contratación laboral. O formas singulares de integración en «talleres ocupacionales» o en organizaciones específicas como la ONCE.

La atención a los ancianos lleva desde el sostenimiento de residencias públicas, o la subvención a algunas particulares, a la realización de **cursos educativos** (incluso a nivel universitario), o a la financiación de actividades vacacionales (por ejemplo los viajes del INSERSO), en donde tampoco son raros los abusos.

La **promoción educativa** y la **formación profesional permanente** se estructuran, básicamente, mediante la programación de cursos, de la que, en muchos casos, resultan beneficiarios los propios sindicatos obreros, o constituyen subvenciones encubiertas a empresas.

La **atención personalizada** plantea servicios tan complejos y diversos como la lucha contra las drogodependencias, la asistencia domiciliaria a enfermos e impedidos, el asesoramiento personal por **asistentes sociales**, o la ya muy clásica asistencia letrada con la designación de «abogados de oficio».

En todo este enmarañado conjunto de **servicios sociales** suele plantearse el problema de si los mismos deben ser siempre facilitados directamente por los poderes públicos, o pueden satisfacerse las correspondientes necesidades por el propio individuo (a costa de la correspondiente compensación monetaria) o por organizaciones intermedias de muy diverso tipo.

La primera opción no presenta, con carácter generalizado, las mismas reservas que se expusieron al considerar la posible racionalidad que podía tener, al respecto, la **comunidad de los pobres**. Al menos, no son rechazables «a priori» (por meras razones estadísticas) la adopción de sistemas como el «cheque médico» o el «cheque escolar», que asegurarían, en muchos casos, mayores niveles de utilidad individual y mayor eficiencia en el sistema.

La segunda, de gran predicamento actual a través del fenómeno de las ONG (Organizaciones no gubernamentales), se presta (en determinados casos y circunstancias) a abusos y desviaciones (incluso delictivas) de las ayudas públicas concedidas a las mismas. Al entrar a valorar las labores llamadas a cabo por las ONG (en general altamente elogiables y llevadas a cabo como **acciones de solidaridad**) suelen olvidarse aquellos casos en que la simple proclamación de unos objetivos pretendidamente sociales (que pueden ir desde la protección al urogallo a la defensa de los colectivos de gays y lesbianas) ha sido mérito suficiente para la percepción de subvenciones públicas escasamente justificables, poco controladas y fácilmente «maquillables».

Sin embargo, su actuación y su presencia sirven para poner de manifiesto que el logro de una **sociedad de bienestar** puede y debe ser buscado por los propios grupos sociales que la integran, que su actuación puede encuadrarse siempre dentro del modelo genérico de **economía del bienestar** y que ésta presenta características que rebasan los límites del Estado de bienestar, entendido como fautor único en la construcción de la «nueva sociedad» distante de los puros y teóricos modelos capitalista o marxista.

La «nueva sociedad» supone la superación del individualismo procaz con el que nace la teoría económica, entronizando al «individuo» como centro y fin de sus inquietudes; pero también la negación de la individualidad, bajo el postulado marxista, tan bien recogido, en su día, por el novelista **Arthur Koestler**, de que «el hombre no es otra cosa que un millón de hombres partido por un millón».

El peligro radica en querer convertir el **Estado de bienestar** en un total **Estado-Providencia**, encargado de proporcionarnos todo aquello a los que creemos tener derecho. A efectos de profundizar en este tema pasaremos, a continuación, a exponer brevemente otros «efectos sociales», sobre el bienestar, de actuaciones públicas de carácter vario.

VIVIENDA Y URBANISMO

El entorno más próximo al hombre condiciona, sin lugar a dudas, su **calidad de vida** y por tanto, las acciones sobre el mismo pueden (y deben) inscribirse en el campo de la **economía del bienestar**. La vivienda es, desde luego, el entorno más próximo en el que se desenvuelve la vida humana, haciendo ésta, relativa y parcialmente, independiente de los condicionantes materiales que marcan su actividad (especialmente los climáticos y meteorológicos). Por ello, desde el principio de los tiempos, la **tipología de las viviendas** constituye uno de los rasgos característicos de las distintas **civilizaciones** desde la más remota prehistoria.

Tratar conjuntamente **vivienda y urbanismo** es consustancial con la esencia de los asentamientos humanos (salvo, en todo caso, en pueblos nómadas); y mucho más en las sociedades avanzadas, donde el «urbanícola» constituye la mayor parte de la población. Cuando mayor es el tamaño de los asentamientos humanos más el **entorno urbano** juega un papel preferencial, frente al **entorno físico**, en las posibilidades de alcanzar una satisfactoria **calidad de vida**.

La primera preocupación, que aparece al respecto, es la de juzgar hasta qué punto las **fuerzas del mercado** son capaces de garantizar, por sí solas, una cobertura suficiente de las necesidades de vivienda (que resulte satisfactoria, en términos de **bienestar**) correspondientes a los distintos grupos sociales. Como quiera que, superado el estado primitivo de ocupación de cuevas naturales, la disponibilidad de viviendas supone incurrir en un **coste económico** y la producción de nuevas viviendas (y la reforma y conservación de las existentes) es el resultado de una **actividad económica**, la correcta solución del problema cae de lleno en el campo de la **economía del bienestar**.

Ya lo apuntábamos al tratar de la **lucha contra la pobreza**. Para determinados grupos sociales (gitanos, marginados, inadaptados, etc.) resulta necesaria una cierta «objetivación» de la forma de satisfacer las necesidades de vivienda de los mismos por parte del **Estado de bienestar**, marcando los límites, y la forma de lograr que la mayor parte posible de la **comunidad de los pobres**, pero también de las familias con **poder adquisitivo** insuficiente, puedan acceder al objetivo de disponer de una **vivienda digna** y adecuada a las necesidades familiares.

Este objetivo se ha impuesto como uno de los puntos fundamentales en cualquier **política de bienestar**, integrando en la misma aspectos muy diversos, que van desde

la fijación de dimensiones mínimas para las nuevas viviendas (según tipificación), a la de garantías sobre calidad, precios máximos, subvenciones a constructores, adquirentes o arrendatarios, etc. En algunos casos, y puesto que las fuertes migraciones pasadas del campo a la ciudad aumentaban las necesidades de vivienda en términos cuantitativos, cabe decir que la **política de vivienda** introducía condicionantes fundamentales en la **economía del bienestar**, llegando incluso (aunque con escaso éxito a largo plazo) a tratar de maximizar la utilidad de la vivienda, no sólo a través del precio, sino adoptando tipología, intermedias entre la **vivienda rural** y la típicamente **urbana**, para reducir el impacto negativo del cambio en la estimación personal del usuario. Tal fue, por ejemplo el efecto, perseguido en su momento, con los llamados **poblados de absorción** (las primeras UVAS) destinados a población de reciente inmigración.

Podrían citarse otros ejemplos de tipología especial en el caso de las políticas de reasentamiento de población chabolista, y en múltiples realizaciones, de la antigua Obra Sindical del Hogar en las propias áreas rurales, o en ciudades de tamaño no excesivo. Por el contrario, otras de sus realizaciones (y la práctica totalidad de los actuales **sistemas de protección oficial**) no plantean, en modo alguno, la suavización del tránsito a las pautas genéricas del «urbanícola puro». Así no es raro encontrar que en el paso de la «chabola» a un piso alto, en un bloque abierto, más de uno pretendía conservar al burro como «animal de compañía»; actitud igual de sorprendente que la cría de patos en la bañera al pasar del «chozo extremeño» a los nuevos **poblados de Colonización**.

La revolución en la distribución territorial de la población española, a partir de los años 50, fue tan rápida y profunda, que difícilmente los poderes públicos pudieron hacer frente a otra preocupación que la de proporcionar un techo a quienes llegaban a las ciudades sin otro horizonte que la de convertirse en «realquilados» explotados, o en causa de un mayor hacinamiento en los hogares de parientes y amigos, cuando no optaban por la posición extrema de la «chabola» o de la «cueva». La penuria de medios financieros a disposición del sector público y la propia escasez de ciertos materiales de construcción fueron acicate, sin duda, para soluciones imaginativas, de muy bajo coste y reducida superficie habitable por familia, sobre las que no es éste momento ni ocasión de extendernos.

Si la reducción del tamaño medio de las familias favorece hoy un mejor ajuste de las «viviendas pequeñas» a las nuevas necesidades familiares, no cabe duda de que hoy merecen una superior consideración los aspectos referentes a la **calidad y comodidad** (en definitiva al **bienestar**). Lo mismo ocurre con el entorno más próximo a la propia vivienda, es decir, con el **entorno urbano**.

En las tres décadas de «penuria pública y social», hasta que nuestra economía logró salir del «subdesarrollo», la elección entre «más viviendas» o «mejor entorno urbano» se decantó claramente a favor de la primera alternativa. La disponibilidad real de **infraestructuras y equipamientos urbanos** (urbanismo, en suma) caminó siempre con retraso (y muchas veces, fuerte retraso) frente a la construcción de viviendas. La actual **sociedad de bienestar** demanda de los poderes públicos todo aquello que puede poner a su servicio el urbanismo actual (transportes públicos, zonas verdes, instalaciones sociales, centros culturales, etc.), sin perjuicio de conceder a la vivienda la máxima prioridad. Sobre todo cuando la generalización (tan acusada en España) del régimen de propiedad, frente al de arrendamiento (pese a sus indudables defectos), ofrece innega-

bles ventajas económicas y sociales. Los inconvenientes del régimen de arrendamiento se agudizaron con la persistencia injusta de la «congelación de alquileres», que agrió la relación «inquilino-propietario», apartó los capitales privados de su tradicional materialización y petrificó el falso principio de que «el casero es tu enemigo».

Por eso, en la actualidad, las acciones de renovación urbana, rehabilitación de viviendas, conservación del patrimonio inmobiliario, esponjamiento del tejido urbano, introducción de nuevos equipamientos y servicios, constituyen parte integrante (e importante) de la **economía del bienestar**, que no puede limitarse al utópico objetivo de «erradicación total del chabolismo», por mucho que hoy mismo figura escrito en los programas electorales de los partidos políticos. Así por ejemplo (febrero de 1999) Izquierda Unida incorpora dicho objetivo, con la promesa de alcanzarlo a tres años.

El peligro mayor de que exista una **insatisfacción social subjetiva**, opuesta, por tanto, al **bienestar**, se encuentra, las más de las veces, en una interpretación errónea del derecho constitucional a una **vivienda digna**. Lo que no pasa de ser la expresión de que a nadie se le puede negar tal derecho en base a diferenciadas de raza, religión, estado civil, nivel cultural, etc., no se puede traducir (como hacen muchos) en que el Estado esté obligado a proporcionar, a todos los españoles, en propiedad, una vivienda gratuita y de la calidad que exija cada uno de ellos (aunque sea entre ciertos límites).

Caer en esa «interpretación lata» del principio constitucional del **derecho a la vivienda** se inscribe, claramente, en el mayor peligro que acecha al **Estado de Bienestar**, que, social o políticamente, se le quiera transformar de hecho, en **Estado-Providencia**. Lo que no es posible desde el punto de vista económico, tal como ha puesto de manifiesto la quiebra de los **sistemas de economía de socialismo real**.

CULTURA Y OCIO

Sin embargo, dicho peligro se manifiesta en actitudes de dejación, por parte de la sociedad, de funciones y tareas propias que, cada vez más, se endosan a los poderes públicos y que éstos utilizan, muchas veces, con fines políticos partidistas. A todos los niveles, pero sobre todo en el ámbito municipal, se entiende y consolida la opinión de que los gobernantes han de facilitar y fomentar la distracción y la diversión del pueblo.

Podríamos reducir este punto a afirmar la resurrección de la vieja política romana de «panem et circenses», pero no está de más incorporar el esbozo de algunos puntos, para que cada cual pueda organizar sus correspondientes reflexiones al respecto.

No cabe duda de que el **concepto de bienestar** no puede limitarse al grado de satisfacción de las **necesidades materiales**; tampoco puede olvidarse que, en general, la satisfacción de las que cabe calificar de **necesidades del espíritu** requiere de actos materiales y de la asunción de **costes económicos**. Es en tal sentido en el que **cultura y ocio** se integran también en la **economía del bienestar**, sin perjuicio de sus amplias posibilidades en el marco de una política general o partidista.

Por razones obvias no podemos abordar, aquí y ahora, la sugerente distinción entre **cultura popular** y **cultura para el pueblo**, pero una y otra reclaman hoy la creciente

intervención de los poderes públicos en su promoción, pero mucho más interesadamente en su financiación.

Parece que ni la sociedad ni el mercado pudieran sostener y desarrollar, como antes, actividades para las que existía una **demanda solvente**. La extensión de la **cultura** y el **ocio** a capas más amplias de la sociedad es la justificación esgrimida por quienes se sienten cómodamente instalados en la **cultura de la subvención**, por su positiva repercusión en su propia economía y por la sensación de poder que proporciona participar, directa o indirectamente, en experiencias, más o menos intensas, de **dirigismo cultural**.

Dirigismo, ya se trate de explotar (o, en ocasiones, de recrear) una cultura «autéctona» o meramente diferenciada en términos de lengua, costumbre, deportes populares o tradiciones reales o inventadas, historias vividas o ficticias, etc. Pero dirigismo también en cuanto a los espectáculos, los artistas, las orientaciones morales, etc.

Otra vez, tras el **Estado de Bienestar** aparece la negra sombra del **Estado-Providencia** al que se exige que subvencione (o financie totalmente) espectáculos variados, que pueden ir de las representaciones teatrales de todo tipo a los conciertos, espectáculos taurinos o pruebas deportivas. Pero que también financie el teatro de vanguardia, las nuevas tendencias musicales, las nuevas películas o su doblaje, las artes plásticas, etc.

El Estado-Providencia es la nueva figura del mecenas **tradicional**. En muchos casos, la compensación que éste último buscaba, en la dedicatoria de las obras del autor protegido, era un hueco en la historia, tal como lo logró la figura del **Conde de Lemos** por su condición de «protector» de **Cervantes**. Hoy la compensación suele hallarse más bien en la perseguida obtención de mayores «frutos electorales», atraídos por el brillo que ofrecen los «nuevos artistas» y los «nuevos intelectuales», más o menos reciclados según los casos.

Los más «castizos» califican de **pasotismo**, la creciente actitud de grupos sociales que reclaman del Estado que les organice su **ocio**, aportándoles la práctica del deporte, el equipamiento que suponen los **clubs de jubilados**, las curiosamente llamadas **universidades populares**, las excursiones y vacaciones subvencionadas, y, al tiempo, la tarea de «ilusionarles» en la aceptación de los distintos programas.

Lo más preocupante, para el propio futuro de la **economía del bienestar**, es que mientras nuestras necesidades primarias pueden quedar satisfechas hasta su **punto de saturación**, éste no se alcanza a vislumbrar para las nuevas necesidades que se crean en este campo. Como dicen que sentenciaba el Guerra (el torero) «siempre hay gente pa tó».

MEDIOAMBIENTE

No por ser el último llegado a ser objeto de consideración dentro de la **economía del bienestar**, es menos cierto que la disponibilidad mayor o menor de los llamados **servicios ambientales** ocupa un puesto prominente entre los condicionantes del **bien-**

estar general. Estos se miden menos en términos cuantitativos que en términos de calidad. Así como el **entorno urbano** se adecua a las necesidades del «urbanícola», mejorando el **medio natural** en términos de comodidad y oferta de servicios, éste último aparece siempre como agredido por la **actividad económica**.

Tal planteamiento «unidireccional», no por extendido deja de ser menos erróneo, tanto si se acepta la inevitabilidad de tal circunstancia, como si se pretende deducir de la misma una contraposición plena entre **economía** y **ecología**. Por contra, es correcta la actitud de quienes, admitiendo los peligros que la **contaminación** de origen humano puede introducir (y de hecho introduce) en el **medio natural**, se plantean críticamente (y no emocionalmente) el estudio de sus problemas, las posibles soluciones aceptables personal, social o económicamente, las incidencias y retroalimentaciones sobre el **bienestar económico**, etc. Y desde luego es preciso desmontar, la consideración simplista de una naturaleza idealizada sobre viejos «clichés virgilianos» en contraposición a la realidad de un entorno donde también actúan (¡y de qué modo!) las fuerzas naturales y las biológicas de todo tipo; sobre un **escenario** lento pero inexorablemente modificado.

El **medio ambiente** o más exactamente, el conjunto de **externalidades** positivas y negativas que el mismo aporta a la valoración subjetiva de la **utilidad** o **satisfacción individual**, es objeto naturalmente de demanda, bien por los servicios que puede proporcionar, o por lo que algunos autores denominan **demanda opcional**; es decir preferencia de la preservación, conservación o mejora del entorno frente a otros bienes o posibilidades alternativas. Lo que importa es que la **demanda medioambiental** sea también una demanda solvente, es decir que la sociedad (individual o colectivamente) esté dispuesta a asumir los costes totales inherentes a su satisfacción, lo mismo en el campo de la producción de bienes comercializables (por su reducción, anulación, o necesaria modificación de las tecnologías productivas), que en el de las restricciones impuestas al **crecimiento económico**.

Todos estos novedosos aspectos de las interrelaciones entre el **medio ambiente** y la **economía del bienestar** requieren un tratamiento más amplio y profundo del que aquí podríamos incorporar.

EL FUTURO DE LA ECONOMÍA DEL BIENESTAR

En términos conceptuales son muchas las tareas a abordar en una necesaria revisión de las primeras intuiciones de **Pigou** y de la abundante literatura subsiguiente, muchas veces sesgada por las limitaciones de la óptica keynesiana. En términos de **política económica** el eje de cualquier inquietud sobre la **economía del bienestar** es, sin duda el problema de su futura financiación; cuyo tratamiento constituye un tema absolutamente monográfico.

Pero me voy a permitir aportar un elemento muchas veces olvidado: la necesidad de educar a la sociedad para que, en cada estadio de nuestra civilización y nuestro desarrollo económico, entienda **qué parte de la utopía resulta apta para intentar su realización** y qué costes (**sacrificio**) es forzoso asumir, a qué cotas de prosperidad material hay que renunciar, qué áreas de individualismo van a tener que ser abandonadas en aras de una difícilmente cuantificable **economía del bienestar**.

Sabido es, sin embargo que, en los foros políticos, la mayor o menor entidad de los llamados **gastos sociales**, en el seno de los distintos **presupuestos públicos**, viene siendo como una especie de «prueba del algodón» para fundamentar el ataque a los poderes públicos por parte de quienes ejercen la oposición, ya sean partidos políticos, sindicatos, asociaciones de vecinos, ONGs, ecologistas en acción, mesas y plataformas diversas, o agitadores sociales de todo tipo. Pero lo curioso del caso es que cada uno tiene su propia concepción de lo que son o no **gastos sociales** en el conjunto de un **presupuesto público**.

Para los mas puristas y radicales serían sólo los correspondientes a los que antes hemos integrado en el apartado de **seguridad y asistencia social**. Para aquellos a quienes menos afecta el **nominalismo** no es sólo que todo gasto público tenga generalmente una **justificación social**, dentro del marco macroeconómico, sino que, muchas veces, ciertos gastos serían incorrectos si sólo se decidieran a partir de una **justificación económica**.

Concluiré, permitiéndome un homenaje a mi condición de ingeniero de caminos (que me viene de familia) y de economista profesional, planteando un interrogante para intranquilizar a muchos.

¿Cabe establecer un planteamiento dicotómico en los presupuestos públicos con una diferenciación neta entre gastos sociales y gastos económicos?

Para incitar a discurrir sobre el tema, pondré un breve ejemplo íntimo. A principios de siglo mi abuelo intervino, desde el Ministerio de Fomento, en la construcción de las conocidas como «carreteras carboníferas asturianas», que se justificaban como necesarias para poder explotar las riquezas mineras existentes y que éstas pudieran acceder a los mercados (justificación plenamente económica). En los años 60, y desde mi puesto en la Oficina de Planes Provinciales de la Presidencia del Gobierno, se apoyó firmemente (y se financió) la construcción de la carretera de acceso al Valle de Valdeón, en la cabecera del Río Cares, valle que solía permanecer incomunicado de dos a tres meses al año por causa de la nieve. Su construcción sólo se justificaba por razones sociales y en el seno de la **economía del bienestar**.

Y este es un simple ejemplo aplicable a una hipotética diferenciación de nuestra red de carreteras (y de tantas otras infraestructuras) entre las que integrarían, teóricamente, un **presupuesto de gastos sociales** o un **presupuesto de gastos económicos**, como los que muchos políticos y asimilados pretenden establecer en términos dialécticos.

El futuro de la **economía del bienestar** no está escrito. Plantea graves dificultades financieras, y negarse a ciertas correcciones sobre su actual «estructura de aluvión» puede ser el mayor ataque a que pueda mantenerse lo esencial de la misma. Para ello es preciso asegurar la permanencia de un **desarrollo sostenible**.

EL JUSTICIA DE ARAGÓN EN JOAQUÍN COSTA

JESÚS LÓPEZ MEDEL

1. ASPECTO HISTÓRICO

El Justicia de Aragón es una institución singular, peculiar, que se anticipa en el tiempo a los «*Ombudsmen*» nórdicos —éstos no son receptores del Derecho romano—; que aparece en tiempos de Trajano por tierras ibéricas dispersas, si bien Aragón, que sabe asimilar sus propias raíces, con ciertos moldes germánicos, le da una textura propia, a partir de los reinados de Pedro I y Alfonso I, en el siglo XII. Es una especie de *Magistrado* conocedor de los *Fueros* —como el de Daroca— valedor y árbitro decisivo en cuestiones que antes decidía el Monarca —Juez y parte—, en especial desde las Cortes de Ejea en 1265. Se trataba no sólo de la función —*hacer Justicia en el Reino*— sino de la Persona, un *caballero excepcional*. (V. Especialmente, *El Justicia de Aragón: Historia y Derecho*, De Bonet, Sarasa y Redondo -Zaragoza 1985)

2. EN LA CONSTITUCIÓN Y EN EL ESTATUTO ARAGONÉS

En un trabajo nuestro —«*Alonso Martínez, en el proceso codificador Civil e Hipotecario*», con ocasión de la clausura de los actos de homenaje de la ciudad de Burgos al insigne político, y jurista, como Ministro que firma el primer Código Civil Español—, aludíamos, a las singularidades de una España, que en el 711 conoce la invasión árabe, la repudia y a la vez, con la que convive, durante ocho siglos. Hablamos de cómo se produce el proceso de «*reconquista*», «*repoblación*» y «*reasantamiento*», que se va consumando, más que por las armas —siempre necesarias— por una *autorregulación* y *normación*, más o menos asentada en sus características. Y sobretodo, enraizada en sus *instituciones*. Y una de ellas, verdaderamente excepcional, es el *Justicia de Aragón*. Digo todo esto —V. Rico Pérez, en «*La responsabilidad civil de los farmacéuticos*», Medio-198, pags. 247, precisamente al hablar con detalle de los «*Defensores Civiles nórdicos*»— por dos razones:

Una de ellas, anecdótica si se quiere, pero afirmativa y cierta: solamente por la existencia de esta Institución del *Justicia de Aragón*, nuestra Comunidad Autónoma de Aragón, debió merecer constitucionalmente ser encuadrada en las llamadas de *derecho histórico*, quizá con mayor predicamento que algunas de las que así se llamaron. (El tema lo dejo aquí para los constitucionalistas del 78, o los que pactaron o negociaron el *Estatuto Aragonés*, aprobado por Ley Orgánica 8/1982, de 1 de agosto, V. Bandrés, Sánchez Cruzat, «*El Estatuto de Autonomía de Aragón*» - Zaragoza 1985, pag. 127.

También Merino, *Comentarios al Estatuto de Autonomía de Aragón*, Guara 1989; y Bonet, *Comentarios Al Estatuto de Autonomía de la Comunidad Autónoma de Aragón*. INAP 1985, dirigido por Bermejo Vera, 327 y ss.).

En el capítulo V, de los Estatutos, art.33 y 34 del mismo, introduce esta figura que se aproxima mucho más al *Defensor del Pueblo* del art. 54 de la Constitución, que la institución aragonesa. Su ley reguladora del 27 de junio de 1985, núm. 4/85 fue incluso impugnada ante el Tribunal Constitucional, prueba de los recelos centralistas, aunque la sentencia de aquel, 142/1988, de 12 de julio, prácticamente dejó incólume el sentido, función y alcance del *Justicia de Aragón*, naturalmente, sin que las partes en la contienda —constitucional—, se apelase a su significado histórico, y aunque la nominación fuera más expresiva que otras, en otras Comunidades (V. Sobre este punto, Balsols «*Código de los Estatutos de Autonomía*»- Madrid, 1983). Creo que Bonet y Redondo aciertan al *relacionar la búsqueda y concreción de lo aragonés*, entre lo que el Justicia representó en el pasado, y en el presente. (Presentación de la obra: *Ilustración a los cuatro procesos forales de Aragón* -Zaragoza, 1985).Y la segunda razón, más importante, es la que me lleva a ambientar el tema de nuestro trabajo:

Joaquín Costa no trata de una manera monográfica, precisa y concreta el Justicia de Aragón. Él es —me remito a uno de los últimos bosquejos hechos de su personalidad, el de Navarro Rubio, en la obra «*Aragoneses en la Real Academia de Ciencias Morales y Políticas. Diputación General de Aragón*» —Iber Caja— Zaragoza, 1989, pags, 47 y ss., con referencias bibliográficas de Fernández de la Mora, Velarde y Vallet de Goytisolo «león de Graus», demoledor de tópicos, autocrítico, luchador contracorriente, tenaz, sugerente y regeneracionista, no ya sólo con las lacras nacionales —«*oligarquía*», «*caciquismo*» etc.—. Sin embargo, el tema del *Justicia de Aragón*, lo trata, fundamentalmente en dos momentos, dentro de su larga obra (V. *Los doce tomos*, por Guara, Editorial Zaragoza- 1981). Como están interrelacionados, vamos a exponerlos seguidamente.

3. PIEZA ORIGINAL DE AUTOGOBIERNO: «COSAS DE ARAGÓN»

Costa desmenuza en su obra escrita y en su acción —«*el dolor común de los españoles lacera el alma*»— las instituciones jurídicas españolas y aragonesas. A éstas, para ponerlas en forma ante la posibilidad de un Código Civil común y general que recogiera las esencias propias, dignas de ser incorporadas al acervo nacional. A aquellas, para lograr la receptividad de las últimas. Pues bien, en el *Prefacio* a sus trabajos referentes a lo que luego habría de llamarse la obra «*Libertad Civil y el Congreso de los Jurisconsultos aragoneses*», que va a tener lugar en Zaragoza del 4 de noviembre de 1880 al 7 de abril de 1881 —ya en la desenfilada, o batalla final ante el Código civil de 1888— hace una afirmación básica, como prólogo o confesión sincera:

«*Decía poco ha en la Academia de la Historia un ilustre literato, que la institución aragonesa del JUSTICIA es de tan conspicua significación y de tan extraordinaria transcendencia que constituye una forma peculiar de gobierno. Podría haber añadido que la única, nueva y original que se ha producido en la Historia desde Aristóteles y Cicerón hasta la centuria presente*».

4. ARAGÓN SE DEFINE POR SU DERECHO

Puede parecer una exageración, máxime si, como antes decía, tales escritos y trabajos se mueven en una idea revisionista-crítica del derecho aragonés, tanto el foral, como derecho privado —esencialmente— como en otras instituciones de significado por público. Y aquella afirmación, la enuncia Costa al comienzo de su *Prefacio*, precisamente para comparar —con parecido énfasis, en su caso— otras instituciones o aforismos, que como el aragonés de «*standum est chartae*», o como la viudedad formal aragonesa, desde la óptica castellana, no se entienden.

La explicación a ese pórtico contundente, al valorar su originalidad histórica desde Aristóteles y Cicerón hasta entonces, diciembre de 1882, fecha del *Prefacio* —«*no se ha conocido una institución similar*»— hay que encontrarla en la fuerza con que —cual filósofo del Derecho— vio siempre, no sólo lo que él llama las «*cosas de Aragón*», sino el Derecho y la Justicia, interrelacionados.

«Aragón no se define por la guerra: *Aragón se define por el Derecho*. Esta es su nota característica, este es el *substrato útil* de toda su historia, con que ha de *contribuir a la constitución definitiva y última de la nacionalidad*. (Lo subrayado es de Jesús Delgado, en la «*Introducción a la Libertad Civil*», ob. cit. pag.23).

«*Los pueblos no son unidades artificiales* que vivan solo en el presente y se amolden a cualquier forma que se les antoje a éste o a aquel filósofo, a ésta o aquella escuela, a éste o a aquel Congreso de Diputados o de Jurisconsultos; son *organismos vivos* que tienen su razón en el pasado... siendo su presente una consecuencia y un *desenvolvimiento* (por grados) de su historia pasada no pudiendo prescindir, por ello de lo pasado, sin destruir lo presente»...

Costa, pues, defiende la modernidad y programa de las instituciones, precisamente desde las singularidades propias, las que han dado raíces, no las tópicas —que las combate—, ya que siempre las configura dentro de un contexto básico y general, «*la libertad civil*».

«Paréceme de toda necesidad principar por bosquejar el *retrato moral* del *pueblo* que representa ... España *no es una unidad homogénea*, ni menos abstracta, sino diferenciada en miembros que son unidades vivas a la vez. Cada una de las regiones de que se compone posee aptitudes especiales para un orden determinado de vida: el pueblo *andaluz*, por ejemplo, cultiva de preferencia los fines *estéticos*; el *catalán*, los *económicos*; el *vascongado*, los *religiosos*; el *castellano*, los *éticos* o *moraes*; el *aragonés*, los *jurídicos* ... (Lib. Civil ob. Cit. 63, ss).

Luego, Costa irá sacando consecuencias de esta adscripción de valores a las distintas regiones; y con respecto a Aragón lo definirá... «*el culto a la justicia, el recto sentido de la realidad, la tenacidad en los propósitos, la prudencia y el arte en el bien obrar y el tacto de la vida*».

5. SOBERANÍA POPULAR Y LIBERTAD

Esa afirmación quizá sea clave para atender —transcendiendo de la esfera del derecho foral, y privado—, el *Justicia de Aragón*. Antes de referirse a ello, Costa, no sin cierta sorna, viene a decir: «*no esperéis de heroísmos y de conquistas para definir al pueblo aragonés... diríase que todo Aragón es una inmensa academia de Jurisprudencia, según el amor con que cultiva el derecho y lee con indiferencia las páginas de la historia guerrera*».

Incluso se pregunta por las estatuas, mejor dicho por la única estatua que se erigía entonces en Aragón, no a los Reyes, Pedro III el Grande, Jaime I, Alfonso I... Alfonso V... ni aún a Zurita, ni Argensola, sino a Pignatelli. Y reitera su frase: *Aragón se define*, no por la guerra sino por el *Derecho*. (*Lib. Civil*, ob. cit.64).

Para situar la concepción costitista sobre el Justicia de Aragón, será bueno recordar algún texto que hoy nos puede parecer exagerado, pero que encaja, anticipadamente, con los criterios de soberanía *popular* —aunque para Costa, habrían de ser limados de «*oligarquía, caciquismo y artificiosidad democrática*»—:

«Sabéis que el Rey en Aragón nunca lo fue «*por la Gracia de Dios*», que en Aragón no habría podido decir Suárez que hubo transferencias irrevocables del poder del Rey por parte del pueblo, porque el pueblo aragonés no entendió nunca que el poder perteneciese a otro que a él mismo, ni que el Rey fuese más que un magistrado, ministro y servidor de la voluntad general. Y de sobra os es conocido el aforismo aragonés: EN ARAGÓN ANTES HUBO LEYES QUE REYES. Y este otro: REY SOIS POR NOSOTROS. Y este otro: NOS QUE CADA UNO VALEMOS TANTO COMO VOS»... Y recordáis que las Cortes podían residenciar al Monarca, y que la insurrección —la «*manifestación*» era un derecho constitucional consignado en el llamado *Privilegio de la Unión*—. Y... procurar «obrar el maximun de bien, el maximun de felicidad... porque sólo así es una verdad el reino de la justicia por la *libertad*, que es la Patria espiritual del Derecho». (Ob. cit. 70 ss.). Aún tiene Joaquín Costa otra expresión gráfica, que nos sirve de coordenada para el *Justicia de Aragón*:

«Cuando el ferrocarril me llevaba a Zaragoza para asistir al Congreso de Jurisconsultos aragoneses, así como se me iba acortando la distancia... ensanchábase el corazón, como si una voz secreta me dijera al oído: «*Vas al país más libre que ha existido sobre la tierra, vas a un país donde la libertad no es una idea, sino un hecho, donde la libertad no es partido, sino nación*... Y cuando la ciudad apareció a mi vista... aquella pintoresca selva de torrecillas y cimborrios de colores que denunciaba a lo lejos el templo del Pilar, se me representó al punto en su carácter más excelso, en aquello que la hace más admirable a mi inteligencia y más adorable a mi corazón, en su carácter de escudo y antemural de las libertades aragonesas...» (Ob. cit. 72 ss)

Esas coordenadas, entre otras muchas, de la definición de *Aragón por el Derecho*, la *modernidad* enraizada en la *historia*, el *Derecho como realidad* viva, el *culto a la justicia* y la *verdad*, la *soberanía popular del poder*, la *libertad como Patria espiritual del Derecho*... ambientan aquel énfasis elogioso en el *Prefacio*, sobre la originalidad histórica de Aragón. Porque, en realidad, en el Justicia de Aragón, se entrecruzan, o se funden, o se sustancializan, no solo los modos de ser o de estar de los *hombres* y

de las *cosas* de Aragón, sino también las raíces de la convivencia y de la libertad. Hubiera sido un mero grito a la Libertad, o un mito, o un destello revolucionario, si en los términos en que Costa reflexionase, se hablase e investigase, desde Aragón por España, y desde España —aunque no le virilaran la cátedra en Madrid— a Aragón. Por el contrario, el *Justicia de Aragón* va a ser la *albúmina* que haga llegar la sangre viva del derecho por todo el cuerpo social; el *espejo* en donde se miren otras instituciones; la *semilla* en que se fundamenten ulteriores frutos, colectivos y personales; la *percha* sobre la que se cuelgue todo el entramado político social, y el *ejemplo* —sellado con la muerte de Lanuza— en el que se miren las *respuestas* para un derecho y una realidad vivas, en libertad.

Repetimos que, a nuestro modo de ver, tanto por considerarla una institución operante, como por el hecho de servir de entramado al mosaico peculiar de los aragoneses, en su *vivir*, en su *sentir* y en su *ser* jurídicos, es posible que Costa no le diera un tratamiento monogámico. Y por tanto, hay que verlo en el conjunto de su pensamiento, de su obra o de su vida. Porque quizá el pudo ser el *Gran Justicia Aragonés* de su tiempo. Lo que no quiere decir, en todo caso, que al filo de un análisis de otras instituciones aragonesas, no nos ampliara, o detallara, con lenguaje de su tiempo — finales del XIX— algo que lo había sido vigente en la larga andadura del Justicia Aragonés.

6. FUNCIONES DEL JUSTICIA DE ARAGÓN

Joaquín Costa va a definir o describir las tareas y misiones del Justicia de Aragón, dentro de un largo *Capítulo 2*, en apariencia, dedicado a otros menesteres, «*Carácter general del derecho aragonés: la libertad civil. El Espíritu del Congreso o de Jurisconsultos Aragoneses*» (ob. cit. «*Libertad Civil*», 61 y ss.). Quiere presentar la originalidad histórica de una buena parte de las instituciones aragonesas, desde el «reconocimiento de la sustantividad de la *persona humana*» al pacto *standum est chartae*; desde la *patria potestad*, a la *viudedad* foral; desde el *hábeas corpus*, al registro de la propiedad —ya en el siglo XV, dice: desde la *curatela*, a la *manifestación, contrafuero* y *firma de derecho*, o el *arbitraje* en política— el Parlamento de Caspe. Y es a continuación de este tema, sin punto y aparte, cuando Costa se recrea más con el tema. Dejémosle hablar a él:

- «Yo no he de deciros donde funcionó durante siglos con maravilloso éxito esa institución *originalísima*, sin igual en los tiempos antiguos, *vitalicia, inamovible y sagrada*».
- «Tal alta como la del rey, más alta que la del rey, no sujeta a los accidentes de la muerte, ni a las mudanzas y vaivenes de la *política*, ni a los cambios de *dinastía*, ni a las *revoluciones* de los pueblos...».
- «Magistratura semitológica, elevada por encima de las miserias de la tierra como una *voz impersonal de la conciencia*»
- «Como una *encarnación viva del derecho*, viviente Némesis ante quien temblaban los opresores y los malvados, siquiera vistieran púrpura o ciñeran corona...».

- «Que *juzgaba* a la nobleza, a las Cortes, al fisco, al pueblo, al rey y a los jueces mismos».
- «Que *dirimía* los conflictos y desacuerdos que surgían entre los litigantes y los tribunales, entre los contribuyentes y el fisco, entre el rey y las Cortes, entre los Diputados y el Rey, entre los poderes públicos y el pueblo».
- «Que *revisaba* y casaba o confirmaba *las reales ordenes del monarca*».
- «Que *condenaba* por injusta una rebelión y hacía caer las armas de mano de los rebeldes, o que, por el contrario ...»
- «Que *declaraba* tirano e injusto al rey, y autorizaba al pueblo para destronarlo...»

7. LAS ESFERAS PÚBLICAS Y PRIVADAS DEL DERECHO

Después de esas definiciones —no exentas de fervor— de la tareas del Justicia de Aragón, como soporte preciso en lo que —siguiendo hoy a D'Agostini en su idea de reciclar ahora pensamientos históricos en *clave de modernidad*—, hablaríamos de *credibilidad* en las leyes, *efectividad* de la Justicia, base *popular*, y no artificial de las normas, *consenso*, paz, respeto a la *persona*... Costa hará una crítica al nacimiento del derecho constitucional moderno, con la hipócrita mixtificación que se llama hoy «lo contencioso-administrativo». Y apela, con cierto énfasis, citando a Kant, a que *tanto el poder político como el civil, se puedan enhebrar en libertad*.

En esta esfera de lo público-privado, y a la inversa, que inspira la mayor parte del pensamiento costista, es por donde puede explicarse la roca viva que representa el Justicia de Aragón. No ya sólo cuando trata de situarlo más al servicio del pueblo-aragonés, con sus instituciones forales típicas, sino incluso cuando Costa mismo se llega a preguntar por *un posible mal entendido*: *¿Será por ventura, que ese fanatismo por la libertad le hace en alguna ocasión olvidarse de la patria?*

La respuesta será no sólo negativa. Sino que vendrá ilustrada (ob. cit. *La libertad Civil*...pág. 73) por determinados hechos, o acontecimientos concretos acaecidos en el XIX, y la actitud —que fue ejemplar de Aragón durante ellos—. «Aragón era la única estrella a donde podían mirar los gobernantes para orientarse y salvar los despedazados restos de la nacionalidad que ya no se habían sumergido»

Y más adelante (pag. 75) se encuentra a mi modo de ver, la explicación más definitiva sobre la fuerza, raigambre y sentido del Justicia de Aragón:

«Porque Aragón, no ha poseído nunca, como Castilla, dos criterios jurídicos, uno para el derecho político y otro para el derecho civil: uno y otro derecho son allí (Aragón) consustanciales y forman a modo una unidad indivisible. No existe, entre aquél y éste, hiato, vacío, ni solución de continuidad. El derecho civil se refleja en el político, y el político en el civil, como si mutuamente se sirvieran de espejo; la misma virtud, la virtud vivificante de la libertad que obra en uno, mueve también al otro...»

Y sigue diciendo:

—*Sólo así podréis aquilatar las excelencias que avaloran la legislación civil aragonesa y discernir las diferencias que la separan de las demás de Europa. Casi todas ellas, informadas, y cuando no inspiradas en el espíritu socialista y absorbente de la legislación romana, que negaba al individuo y a la familia todo carácter substantivo que hacía de ellos términos subordinados, casi dependencias, de la ciudad, ensanchaban más de lo debido y de lo justo la esfera de lo imperativo, a expensas del derecho individual...»*

Pueden verse, en estos textos regeneracionistas, no poco de *profetismo*, si hoy se hiciese un análisis, por ejemplo, del impacto que tiene, o debiera tener todo el contexto de la Declaración de Derechos Humanos 1948, en el orden de los derechos humanos, la referencia esencial a la persona humana —muy clara en Juan Pablo II— que se traduce en lo *público* o *privado*, o el fenómeno de la *administración de lo público* y la *publicitación de lo privado* —del que ha hablado Garrido Falla—, o el *revisionismo constitucional*, o las trayectorias hacia *la Paz*, por la libertad y la justicia.

En esta concepción —hace más de un siglo— de Joaquín Costa, para que no haya un «doble criterio», o una doble óptica, para lo político-público, y para lo personal-privado —aunque la fenomenología de la Codificación tardía en España, quizá lo agrande— está en juego la figura del *Justicia de Aragón*, sin la cual, como antes ya adelantábamos hubiera sido un brindis al sol, toda esa reafirmación de la vigencia de instituciones vivas aragonesas, de orden jurídico privado y público, no pocas de las cuales de alguna manera, aunque no confesadamente, han pasado ya a acerbo del quehacer común de los aragoneses y de los españoles. Esa fue la grandeza y la servidumbre del Justicia de Aragón, aunque elijan como nombre —Los Defensores del Pueblo— lo que era una parte de sus funciones. En este sentido también se puede decir como Fernández de la Mora, que Joaquín Costa *des ganó su batalla púes de morir*. Un poco en línea con la leyenda esculpida en su mausoleo:

«Nuevo Moisés de una España en éxodo
con la vara de su verbo inflamado
alumbró la fuente de las aguas vivas
en el desierto estéril
concibió leyes para conducir su pueblo
a la tierra prometida.
No legisló»

EL HECHO EDUCATIVO EN UNA SOCIEDAD MULTICULTURAL

JESÚS LÓPEZ MEDEL*

En cualquier momento de la Historia de la Humanidad ha sido difícil explicar o interpretar el papel de la escuela. Siempre ha faltado la perspectiva suficiente para vislumbrar, con cierta exactitud, los frutos de una educación, como tarea que se realiza en unos sujetos activos —los alumnos— que habrán de ser los protagonistas de la sociedad futura, a la cual se trata precisamente de «iluminar» o de servir.

Pero todavía resulta más difícil al encontrarnos actualmente en una *sociedad en cambio*, movediza, y para algunos hasta en *crisis*. No olvidemos que junto al factor *sujeto*—protagonista—el alumno en ciernes— la escuela integra de por sí otros, como la *familia*, y el *profesor*, que se encuentran en la sociedad misma, y no como proyecto, sino como realidad viva.

Todo ésto origina que nuestra meditación no vaya fundada en aquellos aspectos que constituyen formulaciones programáticas o genéricas, como los que integran las *Declaraciones de Derechos Humano* que por sí constituyen o debieran constituir una «*filosofía de la escuela en una sociedad multicultural*». Pero tampoco nos situamos en aquellos aspectos superconcretos, de pura técnica pedagógica, que nos descubran en la «*praxis*», los elementos, los factores, o la *instrumentación* adecuada para verificar en la escuela, cuanto desde ella pueda ofrecer, ante una sociedad de aquel carácter.

Dada nuestra formación iusfilosófica, y nuestra propia experiencia educativa, deseáramos movernos en ese término medio que permita, a estilo de Max Scheler, reflexionar sobre el *hecho educativo* y el *hecho de una sociedad multicultural*. Porque, si profundizamos en ellos, su interción o convergencia puede hacer más fácil, para los teóricos o para los expertos-prácticos, encontrar conclusiones de cierta *verificabilidad*.

1. TEMPORALIDAD Y UNIVERSALIDAD DEL HECHO EDUCATIVO

Es significativo que Ivan Illich encontrara las razones para sus «tesis» de una «*sociedad sin escuela*» en el contexto de una realidad latinoamericana, cuyos moldes

* A los ilustres académicos Víctor García Hoz, Ricardo Marín y Francisco Arquero. En su Memoria.

multiculturales o sociales, le hacían ver la imposibilidad de que la escuela —*tradicional*— tuviera ningún papel que cumplir y hasta resultar «*represiva*». Habla Illich en un pasaje del artículo publicado en la Revista «*Esprit*» titulado «*Comment éduquer sans école*» (Junio 1971) de «*la nature répressive, sur le plan économique et politique, du système scolaire*»

Aferrados a un contexto concreto, no podemos elevar las críticas a tesis generalizadas, que invaliden todo presupuesto de la escuela. Se trata, por el contrario de valrar los datos extraescolares —economía, trabajo, técnica, información, lenguaje, psicología, etc.— que han permitido, o bien *ampliar* el hecho educativo, o *profundizar* en él.

El hecho educativo es un hecho de la vida misma. Y sus dos notas fundamentales, sin las cuales no se puede comprender su papel en cualquier tipo de sociedad, son su *temporalidad* y su *universalidad*. Notas que se dan, convergentemente.

La *temporalidad* deriva del sentido de *crecimiento* psicobiológico del hombre y de su sentido natural de *perfección*. La razón de ser del matrimonio-familia no está en alumbrar materialmente un hijo, sino en seguir y conseguir ese otro «alumbramiento» de las respuestas sociales que el *niño* —como protagonista del hecho familiar y del hecho educativo— habrá de dar. Crecimiento *somático* y crecimiento *intelectual* van, curiosamente, a la vez. No es solo medida del *cerebro*, sino medida de la *voluntad*, del riesgo, y de la mayor conciencia que progresivamente va tomando de las cosas, de las realidades, de las lecturas, del aprendizaje, de las palabras.

Y aún cuando tiende a alargarme, modernamente, los períodos educativos, para hacerlos más permanentes o en reciclaje, la enseñanza impartida en la fase típica de crecimiento es la que deja mayor huella y hasta se encuentra marcada por el signo de toda una *generación*.

La temporalidad emana también, o ha de ser vista, en el plano en que aquellos múltiples factores que engloban en lo que se han llamado «las escuelas» y que brotan en la propia historia. Quienes conozcan, hoy, el pensamiento de las ideas políticas, jurídicas o sociales, estarán más próximos a entender los propios condicionamientos que cada sociedad, en su momento histórico, ha encontrado ante su perfeccionamiento, desarrollo o destinación. Se ha dicho con razón, que los grandes filósofos, desde Platón mismo, no eran sino grandes educadores. El que en unas épocas hayan predominado los elementos formativos los irracionales, cosmológicos, o míticos, y en otras los espirituales, los racionales o los fanáticos, precisamente explica la *singladura temporal* del *puesto que cada hombre ha tenido en «su» mundo particular y en la sociedad de cada tiempo*. Y siempre ha existido una línea de sutura, no solo entre las «escuelas» del propio saber, sino en la dinámica de las realidades vitales.

La temporalidad pendería sin alas si no estuviera el hecho educativo enriquecido por su *universalidad*. El que haya zonas todavía donde el crecimiento del hombre o de sus comunidades sea meramente vegetativo o poco más, confirma el ámbito universalista del hecho educativo, ya que es capaz de echar raíces, o brotar de nuevo, cuando se producen determinadas coyunturas, por encima de la sangre, razas, color, sangre, religión, idioma, sexo, etc.. El síntoma más claro de este fenómeno es que el «*despertar*» de los pueblos nuevos, se caracteriza por la «sed» inagotable de saber. Las «*necesidades de educación*», según el informe Faure, crecen en los pueblos jóvenes en

progresión geométrica, y superior a cualquier otro tipo de apetencias. Otra cosa es que, precisamente por esa sorprendente multiplicación, que conlleva frustraciones o contradicciones, no siempre será posible «generalizar» —o globalizar— el hecho educativo.

Pero estas «dificultades» se dan en sociedades concretas. En ocasiones, lo que provoca es el mostrar los *fallos instituciones* de otras dimensiones del vivir, sean políticos, jurídicos, sociales, y con frecuencia lingüísticos. Pero el hecho educativo en su universalidad, está ahí. Precisamente para verificarse cuando se produzcan determinadas situaciones concretas. Se encuentra *en potencia* para hacerse realidad. Lo que ocurre es que aquí vuelve a plantearse el eterno interrogante: ¿es la escuela para transmutar la sociedad misma o a través de la transmutación de la sociedad podemos transmutar la escuela? Quienes tengan presente la temporalidad y la universalidad del hecho educativo se encontrarán más próximos a una respuesta lo mas suficiente posible. Algo de esto haremos a continuación.

2. LA ESCUELA REFLEJO Y PROYECTO DE CULTURA

Hoy se tiende a clarificar la propia terminología que se utiliza, con cierta comodidad en torno a «*instrucción-educación*», «*enseñanza-formación*», «*cultura-civilización*». Incluso como le ocurre a Marie-Danielle Grau, en la obra que citaremos luego, después de un minucioso análisis problemático sobre la «*escuela como realidad política*», tiene que recordar que «*les mots s'usent á force de les entendre trop souvent*»; y luego afirma: «*mais qu'est-ce quel'éducation?* Y también cabe recordar a A. Osterrfeth («*Faire des Adultes*». Bruxelles. Cap. 1, pg.12): «*l'enfant doit fair l'apprentissage de son humanité pour devenir un homme adulte*»... pero «*le but de l'education, ce n'est plus seulement dans ce cas assurer la perennité de la société*».

Pues bien, la inserción del *niño* se da en una sociedad cultural concreta; pero la incorporación o *integración como adulto* puede por de pronto realizarse en una sociedad cultural que sea «*ya*» *distinta*. Incluso dentro de un mismo escenario geográfico.

Ahora bien, ese dato —sociedad multicultural en sentido vertical— se ve acompañado del fenómeno universalista del hecho educativo, que tiende a romper fronteras. Es entonces cuando surge otro fenómeno, el de la *generalización de la enseñanza*, que es ya aceptado por todos cuantos pretenden estudiar la problemática de la escuela hacia el año 2.000. (Nos remitimos, como documentación a los trabajos sobre el Proyecto de «La Educación del hombre para el siglo XXI» de la Fundación Europea de la Cultura, cuyo Comité preside el profesor Jonne de Bruselas, en el que participan expertos mundiales. La serie «Europa 2000" en español, fue realizada por el Instituto Calasancio de Ciencias de la Educación -Madrid.

Es aquí, cuando se suaviza el temor de que una sociedad multicultural sea *barrera* para el hecho educativo. Al contrario, es el hecho educativo el que tiene la capacidad de *romper las fronteras* de sociedades multiculturales, siempre que se tengan en cuenta las dos clases de impulsos que subyacen en la escuela: lo que hay de *reflejo*, y lo que hay de *proyección* creadora, en el más amplio sentido de la palabra.

La cuestión, en su lado más profundo, puede estar relacionado con estas dos grandes preguntas: ¿*El por qué de la escuela?* ¿*El para qué de la escuela?*., La primera,

nos proporcionará datos para entender su *esencia*, la segunda para comprender su *finalidad*.

La amplitud del dato cultural, permite situar a la educación como uno de los elementos que se encuentran en *tensión*. La escuela se realiza en espacio y *tiempo*, en una determinada sociedad. Pero nadie piense, ni aun en las épocas primitivas, que la escuela carece de la *permeabilidad* suficiente para abrirse a otras culturas. O que la cultura —en el sentido igualmente temporal— a su vez, carezca de resortes *flexibles* a otros modelos educativos. La obstinación por no haber visto ese doble juego de resortes, cayendo en barrera en una de ambas aristas; y en ocasiones —como el ya «viejo» intento de una «*novelle école*» —pretendiendo un «neutralismo» de la *escuela por la escuela*, que ha impedido alguno de los efectos importantes que la educación podía cumplir en la sociedad moderna. Ahora, cuando el hecho multicultural se ha generalizado y hasta presentado con urgencias, se ve más clara la necesidad de que el hecho educativo, sin dejar de ser proyecto-creador, sea al tiempo, con prudencia, reflejo asentado de esa misma sociedad. De esperar es que ésto se evite en el futuro, precisamente por el sentido pluridimensional que enriquece —y no asfixia— tal hecho educativo. Lo trataremos en extenso, a continuación.

3. CONCEPCIÓN PLURIDIMENSIONAL DEL HECHO EDUCATIVO

Independientemente de los múltiples elementos *subjetivos* que concurren en la escuela —alumnos, padres, profesores, centros— y *objetivos* o *paraescolares* —institucionales, municipales, Iglesias, lingüísticos, técnicos, información, partidos políticos, Estado, etc.— si se hiciera un corte vertical en la problemática global de la realidad educativa en nuestro tiempo, podríamos destacar, entre otros, los siguientes aspectos que concurren en la modulación del hecho educativo:

Substracto mítico-espiritualista. No es del caso traer aquí una exposición detenida del fenómeno de la mitificación, que late en el proceso histórico de la historia y de las realidades. Nosotros recientemente hemos aludido a ellas, dentro del mundo de lo jurídico, en una ponencia al Congreso Mundial de Filosofía del Derecho y Filosofía Social, «*Concepción del Mundo y Derecho*», Basilea, 1979.

Es verdad que desde Tales de Mileto, Hesíodo, etc. se ha producido un fenómeno de *secularización del mito* por la teología, el de ésta por la filosofía, y últimamente de la filosofía por la Ciencia y por la Técnica. La misma Pedagogía, ha contribuido a poner más al vivo una problemática que anteriormente no afloraba a la superficie de la sociedad.

Pero sería absurdo no comprender, del todo, la pervivencia del «mito» o del «hecho religioso», que pese a la esencialización de lo absoluto parecería se había agotado tras Hegel. Más bien al contrario, estamos viendo no solo modelos de sociedad, como la marxista, en las que anidan fuertes slogan sustitutivos de aquellos otros que se creían arribados por el propio planteamiento marxista, desde la «lucha de clases», a la «reductividad materialista» histórico-dialéctica, de todo tipo de realidades. No entramos en el tema.

La escuela ha de contar, ante una sociedad multicultural, con ese substracto mítico-espiritualista. Ha de analizarlo, estudiarlo, clarificarlo. El «romperlo» sin más puede

ser contraproducente. O en todo caso, con el riesgo de una sustitución por otro, acaso más irreal. Es el caso de Ivan Illich, cuando afirma en el trabajo antes citado en «Esprit»: *Le système scolaire remplir aujourd'hui la triple fonction commune aux églises qui furent les puissances de l'histoire. Il institutionnalise les contradictions du mythe et il est le siège du rituel qui reproduit et voile les dissinances entre mythe et la réalité... L'école est le plus important et le plus anonyme des patron. Elle est le meilleur exemple d'un nouveau type d'entreprise qui succède a la firme capitaliste*».

Aunque estemos en una sociedad en cambio, la cuestión, desde el plano educativo, es adivinar desde *donde se quiere cambiar, y cómo se quiere cambiar*. Aquella reflexión sobre el hecho educativo, como reflejo y proyecto, viene bien tenerlo en cuenta, aquí. Porque en lo profundo de lo humano, y con mayores o menores connotaciones, subyace ese sentido trascendente del hombre mismo, como pauta interior, que le hace perfeccionarse. Si el educador, al simple ejercer su tarea, ya, para el educando, supone un acto de *fe* en el alumbramiento de conocimientos para su aprehensión, no digamos cuando en el aspecto macrosocial, macrogeográfico y macrocultural, hemos de emplazar el hecho educativo ante sujetos activos tan dispersos y variados, incluso a la hora de entender ese *sentido trascendente o eternal del hombre mismo*, que le hace explicar o justificar su misma existencia en una sociedad concreta. (V. Schwartz, en «Proyecto de Educación Permanente»-Madrid, 1976, cap. *¿Hasta donde puede el sistema educativo corregir las desigualdades culturales?*, pag.49 y SS).

Prospección socio-geográfica. La escuela está asentada en una realidad sociogeográfica concreta. Desde Montesquieu se ha avanzado mucho a la hora de explicar cómo el mismo «*espíritu* de las leyes —y lo apuntaba además como estilo «educativo»— brota en atención a una *morfología social*, entorcida por los climas, las latitudes, las temperaturas, las razas, las geografías.

Desgraciadamente ha habido mucho «cantonismo educativo»; pero también el riesgo está en los *transplantes utópicos*, o al menos equívocos, sobre sistemas o técnicas educativas, sin tener en cuenta, cómo prospección, esos datos sociogeográficos que concurren en la escuela. Incluso dentro de una misma comunidad-nacional, la escuela rural y la urbana, suponen contrapuntos fuertes, que hay que confrontar o atenuar. De tal manera que aun cuando se habla del fenómeno de «burocratización» por ejemplo de la escuela, su incidencia en una u otra estructura educativa es muy distinta. Como le puede pasar al «horario», a las zonas «ajardinadas» o no, a la aproximación o no con la «comunidad eclesial» etc.

En una sociedad multicultural o pluralista, partimos de la *escuela que tenemos*, a la *escuela que quisiéramos tener*, dentro de lo que llama Torsten Husen (en su trabajo «El modelo de las escuelas del mañana», en el Vol. «Seminario Internacional de prospectiva de la educación» Madrid 1971, 159 Y SS), la «*learning society*». No podemos desconocer esos datos sociogeográficos. Gran parte de ellos, una vez conocidos, nos darán el *grado y medida*, de esos otros más específicos, que nos van a facilitar el *contenido* del hecho educativo: factores étnicos, la movilidad geográfica, circunstancias temperamentales, problemas sanitarios, el ya citado de la burocratización, el de las comunidades trabajadoras, circunstancias familiares, etc.

El hecho educativo hay que analizarlo desde allí *desde donde se parte*, y se valora en el *proceso final* desde su punto de partida. Está bien que se trace una *meta*, y que

ponga las técnicas más avanzadas. Pero no se puede standarizar ni «industrializar» el hecho educativo, saltando esa dimensión sociogeográfica, para buscar, por ejemplo un mero crecimiento *cuantitativo* y no el *cualitativo*, que quiere decir, una auténtica aprehensión por los educados, que es lo que en el fondo constituye una cultura, para la que la «calidad» de la enseñanza será una constante.

4. LA ESCUELA COMO REALIDAD POLÍTICA

Los datos antes indicados, su misma variedad y riqueza, nos llevan a la necesidad de preguntarnos, cómo y de qué manera se reordenan aquellos factores. Y aun más claramente: que instituciones pueden contribuir a configurar el modelo o sistema educativo en una sociedad multicultural. La obra de Marie-Daniella Grau, «*L'école, réalité politique*» -Paris 1974, resulta muy útil, trasladando el planteamiento crítico que hace de la escuela en la sociedad de nuestro tiempo, a los supuestos más globales por un lado, pero a su vez más problemáticos en una sociedad multicultural. Su propia conclusión final, es para nosotros luminosa: «*La pratique éducative, quelque limitée qu'elle soit dépasse toute autre praxis: économique, sociale, politique. Ousique ces praxis sont les objets successifs d'une reflexion et d'une formation á but éducatif, elles sont secondes par rapport á cette pratique ultime: l'éducation. En fail, la vrai politique de l'éducation dépasse toute politique. La politique de éducation est su-bordonnée á l'éducation, qui la transcende*» (El subrayado es nuestro).

Una vez aclarado el sentido que debe tener el hecho educativo como realidad política, y sobre todo, partiendo de la nobleza con que los términos «*escuela*» y «*política*» deben ser manejados, creo que necesariamente nos tenemos que enfrentar con dos aspectos genéricos sobre los cuales inciden y confluyen: son los *factores socioeconómicos*, y los *estructurales*, que examinaremos a continuación.

Factores socioeconómicos. El contenido plural, tanto del hecho educativo como el de la sociedad multicultural obliga a considerar aquellos aspectos —además de los mítico-espirituales o políticos— que como en todo tejido constituyen la urdimbre de uno y otra. Hoy, la historia de la civilización, nos puede recordar, precisamente por la temporalidad y universalidad del hecho educativo al que antes nos hemos referido, cómo se han dado supuestos macroculturales —como el *azteca* o el *persa*— como respuestas a determinadas situaciones de esta misma índole socioeconómica; y que —como camino hacia el año 2.000— pueden incluso *reaparecer* en áreas geográficas o continentales tan dispersas como las del mundo latino-americano, el árabe, el judaico, o el indio.

Nuestra primera afirmación es que el hecho educativo *ha de contar* —no nos atrevemos a decir, ha de partir— de esos datos socioeconómicos. El *proyecto* o modelo educativo —se trate de *alargar la edad de escolarización*, o de extender la «licencia-trabajo educación»—, ha de contemplar esos supuestos, que aparentemente son muy específicos, pero que en conjunto, comporta todo un sistema capaz de ser aceptado o no en las comunidades concretas. Y todo lo que sea «forzar» en demasía esos factores, se corre el riesgo de establecer una *escuela en el vacío*. Es más, se trata de fijar adecuadamente el ritmo, por un lado, y por otro, la meta de la educación misma. Para no caer en los fenómenos de «contestación», «rechazo» o «revolución» a que luego aludimos.

En un primer momento, la dicotomía de países *desarrollados* y *subdesarrollados* hay que hacerla meramente indicativa, en el sentido, por ejemplo, de que la Declaración de los Derechos Humanos del Niño, afectan a toda la comunidad internacional. Pero sería falso *deslumbrar* los «derechos humanos» en torno a la escuela y al niño, si utilizáramos a priori una metodología político-educativa igual en Suecia que en el Congo. ¿Cuáles son esos datos socioeconómicos?

Aquí no vamos a analizarlos, primero porque no es éste el tema, y segundo, porque lo que importa es la *adecuación real* entre el hecho educativo —reflejo y proyecto— y la sociedad multicultural concreta. Además, porque en el *incesante retorno* de la educación, no sabemos aún hasta donde conduce el tipo de una educación despersonalizada que concurre en una sociedad de superconsumo, de masa o industrializada o burocratizada; o por el contrario, aquel otro que parte de unos valores y pautas, todavía purificados del sarampión en que la vida y la sociedad moderna se debate. Desde la escuela pueden aun «redescubrirse» esos valores perdidos en aquella.

Aquí se impone, sobre todo, una *concienciación universal*, del índice multiplicador para la paz, el desarrollo, la convivencia y la justicia internacional; para entender que sólo, o preferentemente, a través de la escuela, puede llegarse a conseguir, en el mismo orden mundial, aquellos mismos valores. Surgen dos consecuencias mínimas:

La primera es el *respeto* a las características étnicas, idiomáticas, racionales, religiosas, geográficas, económicas y sociales de los pueblos, para que sea partiendo de ellas, sin «burocratización» u «occidentalización», como pueda llegarse al desarrollo educativo, incluso combatiendo fuertemente que la «escuela» pudiera ser un subterfugio de «colonización» interior.

Y la segunda, es la necesidad de *comprensión* y de *solidaridad* de las escuelas en esta fase de entender cómo el hecho educativo en una sociedad multicultural, pese a esos datos socioeconómicos, no se repelen con ellos, sino que se autoexigen. La *uni-formidad* de una cultura, no puede llegar a ensoberbecer todo ese otro proceso, dentro de una dinámica mundial.

5. LA ESCUELA COMO ESTRUCTURA

Otro aspecto del hecho educativo como realidad política lo encontramos en la escuela como *estructura*, es decir, como soporte no meramente material, al que cada vez más se le tiende a destacar y distinguir. La importancia a este dato viene dada por dos tipos de razones: en unas situaciones cuando se trata de escenarios geográfico-vitales en los que las otras dimensiones del saber educativo, cuentan poco: sería el caso de zonas subdesarrolladas en las que casi *se parte de cero*. Y en otras casos, por el contrario, cuando la manipulación política o religiosa, o el rechazo de la escuela por los propios sujetos protagonistas —los alumnos— obligan a la búsqueda de un núcleo, con pretensiones de «neutralidad» sobre el cual operar, mientras se diluyen o se superen las causas del «desconcierto» o de la «crisis» del hecho educativo. Y en todo caso el tema de la escuela, como estructura, se enriquece.

La cuestión aquí no puede quedar más que meramente apuntada, con algunas afirmaciones fundamentales al objeto de nuestra preocupación fundamental:

Riesgo de «inflación estructural». La escuela como estructura, en cuanto instrumentación de medios y servicios, renovación de métodos, sistemas y subsistemas escolares, debe entenderse como algo permanente, inmerso, incierto, y razonable, sin caer en la hinchazón, o el dogmatismo. Casi diríamos que es algo inacabable.

Hay que tener conciencia de sus propias limitaciones, ya que la «obra humana» que se lleva entre manos, reúne todas aquellas características. El profesor de la Universidad de Roma Aldo Visalberghui, lo razona así: *Tout cela signifie que si les écoles doivent survivre, toute tentative de faire des prévisions fondées sur ce sujet doit s'appuyer sur des méthodes nouvelles car il est hautement probable que «clases» «professeurs», «écoles» e autres, perdront toute signification* (Rev. «Education» -oct.1971-42, art. «L'Education au XXI siècle»)

Relación con la estructura familiar. La «estructura escolar» —con las atemperaciones antes apuntadas— en todo caso debe ser *relacionada*, por no decir condicionada, a la estructura familiar. *La familia es escuela en sí misma*, y aun cuando se llegue a renovaciones en los sistemas pedagógicos, no le podrá pasar desapercibida a la enseñanza el lado familiar. Es significativo el llamamiento que en tal sentido están haciendo los reformistas y planificadores de educación al regresar de países de África o Asia donde se han querido trasplantar modelos o estructuras pedagógicas teóricamente perfectas. La CMOPE, por el lado del profesorado, ha hecho llamamientos reiterados a través de su Secretario General, Thompson (V. nuestro trabajo, «*Un diagnóstico sobre la Enseñanza*» -Madrid 1978)

La escuela como estructura jurídica. Una última faceta que señalamos aquí es la de la necesidad de construir, y clarificar el hecho educativo dentro de la complejidad de las estructuras jurídicas, en cada país y en el conjunto de los países.

El tema es muy ambicioso, porque supone, por un lado, penetrar en la interferencia de *sistema jurídico y sistema educativo*, problemática que apuntaba en el Congreso Mundial de Filosofía Jurídica y Social de Bruselas, 1971, el profesor A.Salémi, en su ponencia «*Raisonnement juridique et raisonnement éducatif*» (pag. 579-585, del Vol.-Actas «*Le raisonnement juridique*»-Bruselas 1971):...«*comme dans la société d'aujourd'hui la crise du droit et la crise de l'éducation sont étroitement liées avec la crise de l'autorité, il ne sera peut-être pas inopportun d'analyser les deux attitudes, la juridique et l'éducative*».

A su vez hay que contemplar el problema por el lado de *cómo o hasta qué punto* la estructura jurídica de un pueblo puede *ayudar*, o por el contrario erosionar o *asfixiar* un sistema educativo. La cuestión, que tiene suma importancia ante el planteamiento del hecho educativo en una sociedad multicultural, la podemos ver reflejada en unas cuantas preguntas:

¿El aparato Jurídico-administrativo está al servicio de la escuela, o a la inversa?

¿Los sistemas de poder del Estado, frenan o acrecientan el papel de la escuela en una sociedad concreta?

¿La libertad de enseñanza, el derecho a la educación, la opción educadora de los padres para elegir centros para sus hijos, que queda formulada en estos Declarativos

Internacionales, al llegar a terreno de la «escuela», se quedan o no en meros textos programáticos, o incluso son tergiversados o infringidos por las fuerzas políticas?

¿Los planes educativos nacionales no son barrera para la planificación escolar?

¿Los derechos del niño, como tal, en cualquier tipo de sociedad y de cultura, son puestos en la primera línea de preocupaciones o se utilizan para fines ideológicos o partidistas?

¿Los tipos de escuelas, públicas o privadas, quedan homologadas como principios básicos, o por el contrario el monopolio estatal de cada país, de suyo y además representa una barrera para la escuela y toda clases de escuelas en una sociedad multicultural?

¿Los sistemas educativos, y los soportes financieros que suponen, pueden verse drásticamente sometidos a las turnancias políticas y poderes públicos concretos, o por el contrario necesitan para su realización continuidad y autonomías propias? (V. como documento la obra de Olivier D'Estaing, «Education et civilisation» Pour une revolution liberale de l'enseignement-Paris 1971. especialmente pags. 67 y ss.)

6. TIPOLOGÍA DE LA ESCUELA EN UNA SOCIEDAD MULTICULTURAL: GLOBALIZACION DEL HECHO EDUCATIVO

Ante este panorama problemático, es fácil entender que no cabe una solución mágica, ni única. La escuela está haciéndose. La educación es un *proceso*, hemos recordado en nuestra obra «*La Educación como empresa social*» (Madrid 1974). Pero lo importante es tomar conciencia del hecho educativo en una sociedad multicultural, la cual, de por sí no constituye un escenario uniforme, sino que se encuentra en constante mutación o *transformación*, y en la actualidad, dentro de su globalización.

De aquí que lo más significativo sea el subrayar aquellas *dimensiones* varias que componen aquella sociedad. Aquella también podrá variar, en grado y medida, pero no sería poco advertir los *datos mismos*.

En atención, pues, al carácter no dogmático y respondiendo a uno de los puntos iniciales de nuestro tema —la temporalidad y universalidad del hecho educativo— como resumen o conclusión, vamos a señalar los rasgos, *características*, o más concretamente, la *tipología* básica de la escuela en una sociedad multicultural. Las consecuencias prácticas de ello —en el orden técnico-pedagógico, en la metodología, o sistemas, «currículum», niveles, organización, financiamiento, etc.— pueden resultar más fáciles para el experto. Siempre con la perspectiva de la penetralización globalizadora.

Escuela omnicomprensiva. Al dato de *no existir un solo modelo* o un solo proyecto de *sociedad multicultural*, se corresponde algo, que igualmente resulta cierto en el plano de la enseñanza: no es posible pensar en un solo modelo o proyecto de *proyecto educativo* y aplicable tecnológicamente hablando a aquella sociedad.

Esto resulta así, no solo por los factores *espacio* y *tiempo* en que hay que situar el desarrollo o camino de una sociedad sino también porque el hecho educativo tiene que

contemplar aquellos dos aspectos convergentes: en lo que tiene de «reflejo» y lo que encierra de «proyecto». Se trata de medir *dónde estamos* y a *dónde queremos llegar*. Y con qué *medios* y *plazo* disponemos. Sin saltos en el vacío.

Precisamente por ésto, esa graduación o medida debe contar con los *contenidos* pluridimensionales de cada sociedad en concreto. Decir, «escuela del año 2.000" puede resultar peyorativo. Decir «escuela» de unos países, y aun de unos continentes puede resultar muy «singular». Hay *escuelas*, en *sociedades* multiculturales.

Es así, como nos hemos atrevido a tipificar, más que el *para qué* de escuela, o el *porque* con la denominación de *escuela omnicomprendiva*: aquella que no pierda de vista las dimensiones mítico-espirituales, las socioeconómicas, las geográficas o étnicas, las estructurales o jurídicas. Frente al *nihilismo* al que pudiera llegarse al contemplar tanto problematismo, hay que advertir la *riqueza* de aquellos factores, y tomarlos en cuenta no unilateralmente, sino en *su conjunto*.

Ha ocurrido, con frecuencia, en las planificaciones escolares, la *tentación* de profundizar más en algunos de los datos más que en otros, sobre los que aparentemente se vislumbraba un mayor éxito, en algunos casos halagador para el *político* de turno, y en otros *deslumbrador* para el experto. El profesor Gozzer de Roma nos hablaba en Fraschatti hace unos años, sobre la necesidad de una meditación, de un *reposo*, ante la velocidad con que fenómenos y planificaciones se han dado. Han surgido *mitos*, como el de la *gratuidad*, la *escolarización* masiva, la *construcción* ideal de escuelas, la transmutación de *niveles*, las condiciones técnicas del profesorado, la «*nueva escuela pública*», o la asfixia de la escuela privada. Las «grietas» del panorama educativo se han querido tapar o cubrir, mejor que impedir, ya que la *interdependencia* de los factores y dimensiones del hecho educativo provocan otras interdependencias, y cualquier medida que no tenga en cuenta o los cimientos, o las estructuras, o los niños, etc, puede desequilibrar, todo el esquema educativo en su conjunto.

En tal sentido, pues, hemos tipificado como *omnicomprensiva* a la escuela del futuro.

Escuela participativa. Salvo en los supuestos de escuelas sometidas radicalmente al «monopolio estatal», y por tanto sujetas a las esferas del «poder» con su *control* en todos los órdenes, la variabilidad de aquellos factores y dimensiones —que se encuentran en *movilidad potencial*, o que actúan *dinámicamente*— obliga a *estimular* en el seno de la escuela y aún en el conjunto de una política educativa, los resortes participativos.

Ya hemos indicado los riesgos y desengaños del planificador. En una sociedad moderna, en la que existen *además*, como diría Elliot L. Ricardson, «*esperanzas y retos de la educación en una sociedad posindustrial* («Seminarario...ob cit. 15 y ss.) es posible el *error*. Y los errores en materia de enseñanza son mucho más caros que los que puedan ocurrir en una operación financiera. Pero la manera de cubrir el riesgo, y todavía más, de hacerlo positivo, es que en las tomas de *decisión* —a niveles de una política sobre la escuela— o la configuración de las estructuras educativas —la escuela en sí misma— sean con *participación directa e inmediata de aquellos sujetos* que, en cada lugar y tiempo, *hacen la escuela*. Me refiero singularmente a padres de familia, profesores, alumnos —desde determinados niveles— las escuelas mismas y las comunidades territoriales o sectores de producción y de trabajo en cada caso.

La denominación de esta tipología es variada: escuelas *integradas*, escuelas *comprendivas*, escuelas *comunitarias*, escuelas *autogestionadas*, etc.,. No hacemos hincapié en el nombre. Sí en la *filosofía participativa*. El grado y medida lo dará el escenario sociovital de la escuela. Habrá supuestos en los que la *célula familiar* —por ejemplo a través de las «*escuelas de padres*» en Estados Unidos— esté mejor preparada para unos casos, y no en otros. Otro tanto ocurre con el profesorado, o los alumnos, según su propia organización profesional, sindical, o estudiantil.

La dinámica en las dimensiones del hecho educativo —incluso las de orden religioso o étnico, subdesarrollo o estructura administrativa— ha de corregir su punto de mira desde el lado de las «*respuestas sociales*», la *información* y sobre todo la *participación*. ¿Cómo vamos a *digerir* el fenómeno «contestatario» ante la escuela como a otros efectos nos han «denunciado» Bay, Chomsky, Engler, Windmiller, y Zahn, entre otros?

Cierto es que caben extremismos, cuando el tipo participativo es utilizado para fines «*extraeducativos*». Como puede ocurrir cuando la autogestión está vista como gestión del *trabajador-profesor* de carácter meramente reivindicativo frente al centro-empleador. O cuando el «padre» actúa como intercesor y valedor, no como colaborador o responsable. Pero la ventaja de la escuela participativa es que permite que se tiendan a equilibrar, recíprocamente, los grados y medidas de cada sector, por lo menos en un primer momento. Con lo cual —salvo cuando surja la «rebeldía» o el hecho «revolucionario» a través de la escuela— *ya se está haciendo escuela*. En todo caso siempre el Estado puede establecer fórmulas generales de participación sectorial, o puede tener órganos que clarifiquen aquella, como el Tribunal Constitucional en Alemania que sentenció que la *cogestión obrera* no es aplicable a los centros de enseñanza, como empresa; o el de Estados Unidos aclarando sobre las subvenciones de ciertos Estados a los centros de la Iglesia Católica; o los «compromisos» periódicos del *Pacto Escolar* en Bélgica; o los «Consejos Escolares» en Holanda, o Francia.

Ocurre que el lastre de la «administratización» o «burocratización» de la escuela en ciertos países, implica dificultades. Pero ya, en no pocos países donde esta nota predominaba, se intenta superar. Al contemplar el fenómeno de la escuela con las perspectivas de una sociedad multicultural, la *escuela participativa* como *comunidad educativa*, es un tipo que *hay que llegar* y desde el que hay que partir. El acierto estará, en buena parte, en cómo se estructura tal participación (V. Casado en «Comunidad educativa»-Madrid-1978).

Escuela competitivo-creadora. Las mutaciones socioeconómicas y aún políticas que percibimos a nuestro alrededor, ya por sí solas, obligarían a sustituir las planificaciones educativas -tipo, por la *visión competitiva y creadora de la escuela*, en sí mismo considerada. Los fenómenos de *reconversión* empresarial, los de emigración interior, los que son producto de prevalencias económicas —como los países árabes por el petróleo— o de carácter político-nacional —como los pueblos de África, o de Israel hacia el encuentro de su propia personalidad o frontera geográfica— o de carácter social —como buena parte de las naciones hispanoamericanas ante el hecho norteamericano— por citar algunos meros ejemplos, aparentemente tienen su *tratamiento* en esos mismos ángulos geopolíticos, sociales o económicos.

Pensamos, no obstante, que dentro de una sociedad multicultural, la verdadera *solución* ha de brotar de la escuela. Pero no vista como instrumento de descolonización

o de «extranjerización». Al contrario, la escuela vista como riqueza competitiva y creadora, que no destruya sus *propias peculiaridades*, sino que armónicamente agrandadas, que acerquen las comunidades de los pueblos, a través de la educación (lema de la ISA y FEDE, de manera peculiar), y sea por principio, *integradora*.

He recordado no pocas veces el ejemplo de Roma, para la cual la conquista de nuevas fuerzas, se veía facilitada por el «estímulo» que los *pueblos* sometidos encontraban en la Cultura y en el Derecho Romano.

En la sociedad actual, del consumismo y de la masificación, sólo a través de la escuela puede lograrse la promoción y la competitividad adecuadas, ya que el «estirón» del *sujeto educando* agranda y estimula a toda la comunidad.

Por eso, por ejemplo, me preocupan los planteamientos político-pedagógicos que quieren utilizar la escuela —alargando el período de escolarización, hasta los 18 o los 20 ó 25 años, según distintos supuestos... por razones meramente pragmáticas: como solucionar el paro, facilitar la reconversión, «sometimiento» dócil a la población que normalmente estaría en servicio militar, etc., *La escuela no puede ser una «tercera edad» anticipada*. Tiene que ser fermento creador, y si se quiere, *imaginativo*, y no «grupo de presión». En todo caso, pudiera producirse una *desnaturalización* de la escuela.

Sobre todo es consecuencia —como dice Grau, en «*L'école*»... ob. it. 104— de «*l'idée de participation, d'origine politique*». Y de los efectos multiplicadores, por ejemplo, de la relación escuela-familia. O de la superación de escuela como *empresa-lucha de clases, de étnicas, de naciones, etc.*

La última «ratio», fundamental para una sociedad en desarrollo y multicultural, se encuentra en que *desde la escuela* es donde pueden iniciarse y proyectarse los auténticos supuestos de desarrollo científico, cultural o industrial.

No se puede hacer la casa por el tejado. Y como los rasgos de la sociedad cultural del futuro no son del todo previsibles —salvo para los políticos demagógicos— la escuela *competitiva*, que parta de la experiencia de sus métodos, de la permeabilidad de programas, del respeto y admiración recíprocas sin interferencias banales— puede ser el caso del pequeño país, con sus cantones, de Suiza, y últimamente de Alemania —por citar algunos ejemplos vividos— es la que se presenta en un primer plano de *operatividad* ante una sociedad multicultural aún no plenamente configurada.

Escuela «internacional». Una sociedad multicultural, por sí misma, y también por las múltiples dimensiones que concurren en el hecho educativo, es una *sociedad interdependiente*. El «*hecho internacionalista*» en nuestro tiempo es algo digno de ser estudiado y entendido en profundidad, y no sólo en la patología de la comunidad jurídica internacional.

Los medios de comunicación social, de transporte, las interferencias sanitarias, monetarias, diplomáticas, económicas, social-emigratorias, etc. así como las comunes tendencias a la «occidentalización», industrialización y mayor papel de los países llamaos del Tercer Mundo, serían por sí solo factores para cualificar a la escuela del futuro como «*escuela internacional*», en el sentido de que sus técnicas pedagógicas,

niveles, objetividad en las enseñanzas, planificación, etc, contuviera fermentos de «*aproximación educativa*».

Y con ésto ya queremos subrayar que no pretendemos que todas las escuelas sean «escuelas internacionales», como instrumentos convalidatorios, porque eso sería un ideal. Pero sí, que la «escuela» constituya un reducto de «*solidaridades*», a nivel mundial. Bastaría la *concienciación* del hecho, y un anutua *comprensión*, para tener ya la primera piedra de una escuela en la sociedad multicultural. Se dirá que acaso, lo primero es que *haya escuelas*. Pero al tiempo, merece la pena pensar de qué manera los esfuerzos educativos mundiales constituyen la primera fase de *aproximación* de las escuelas, que al ser *participativo-creadoras*, permiten la aproximación, entre sí y entre las propias comunidades. Para que en unos casos dejen de ser «*privilegiadas*», y en otros «*residuos*».

La escuela «internacional» podría tener el riesgo del «uniformismo». Pero estamos muy lejos, Al contrario, hoy ya padecemos el del *aislamiento*. Y la primera barrera es el *lenguaje*. Por eso, sin llegar al problema de la *concurrencia* u *homogeneidad* de *contenidos* en los sistemas educativos —cosa fácil en las Ciencias Naturales—, existe un primer paso en tres tipos de cuestiones:

- a) las de los *métodos* y *sistemas*, buscando en las experiencias comparadas las reacciones que pueden ser comunes a profesores y alumnos ante comportamientos y *actitudes* concretas.
- b) la aproximación en los contenidos de las *Ciencias Humanas*, buscando, primordialmente la propia *objetividad* —Historia, Gramática, Geografía, etc. (V. Marín Ibañez «Interdisciplinariedad y enseñanza en equipo» -Madrid, 1979).
- c) estímulos a la enseñanza del *tercer idioma*. Piaget («*Tendencias de la investigación en las Ciencias Sociales*» Unesco 1970, destaca *el fenómeno lingüístico*, como *fenómeno de aproximación*. Y fracasado el «esperanto», de lo que no cabe duda es que la escuela que predispone a sus alumnos al tercer idioma, ya de entrada, se encuentra con mayores posibilidades de insertarse en una sociedad multicultural, la cual forzosamente habrá de ser *plurilingüística*. El «lenguaje» es el auténtico instrumento de penetración y comunicación, por sí mismo considerado, pero mucho más cuando se trata de medio de *intersección* de culturas, de comprensión y de solidaridad mundial. En ese sentido es como hemos tipificado el rasgo de escuela »internacional».

Escuela-humana. Al configurar, a través de una experiencia histórica válida, un tipo de escuela susceptible de presentarse eficazmente en una sociedad multicultural, no podemos partir de cero; pero tampoco cabe agrandar las limitaciones.

A las características anteriormente expuestas, hay que añadir, finalmente, esta otra: *escuela humana*, o, del *escuela al servicio hombre*. Y como añadiría Faure, de «*todo el hombre*».

Para un educador, filósofo del Derecho, nada nos es más grato que advertir las corrientes de *opinión* en el orden educativo que cada vez ponen más énfasis en este aspecto. El maestro español, Legaz Lacambra (en «*Socialización y libertad en la*

Educación». Madrid 1973), recordaba —de la mano del hegeliano Von Stein— cómo «toda educación como posesión de bienes espirituales, conocimientos y capacidades, es, en primer lugar, un hecho individual. Pero que el individuo se encuentra dentro del orden social. El desarrollo de la educación es así comienzo del desarrollo de la libertad»... Y más adelante añade: se dirá que la educación es la que hace al hombre persona, y como la persona vive en sociedad, la educación realiza al hombre, es decir, por ella adquiere el hombre su plenitud y su realidad humana (luego el maestro Legaz recuerda nuestro punto de vista al respecto en nuestra obra «*El Derecho al Estudio*»-Madrid 1970).

Pues bien, si no queremos perdernos en la «*complejidad*», el «*problematismo*» o la «*perplejidad*» ante el tema de la escuela, hemos de contar con una *referencia al hombre mismo*, con todas aquellas dimensiones múltiples que a su vez las transmite a toda la comunidad, en ese *escenario* que hemos llamado *cultural*.

El sentido de perfección y de crecimiento, y el contexto socioeconómico o geográfico etc, en que se mueve el hombre, es rico en matices. Pero ni la raza, ni el color, ni el poder, ni el clima, ni el hecho religioso han sido capaces de destruir el reducto *íntimo de lo humano*. Y cuando cataclismos físicos o bélicos han descargado sobre la humanidad, ha vuelto a resurgir el hecho humano —que es libertad y socialización— con toda su trascendencia, y con todos sus valores personales y eternos.

La escuela que quiera ser válida en una sociedad internacional, junto a aquellas características, ha de ser una *escuela humana*. Es decir, proyectada, prevista, incluso soñada, en el hombre mismo, y con todas las cualidades y respeto que le merece su propia dimensión personal, y la propia cultura, raza, sexo, etc. en la que se encuentra. Es a partir de ahí, donde se producirán las naturales opciones, que la propia escuela facilita. No hay poder humano que «naturalmente», es decir, sin artificiosidad, pueda trastocar la *dignidad personal* que cada cual, en la escuela, espera agrandar (V. n. Discurso de ingreso en la Real Academia de Doctores «*Hacia un nuevo Derecho a la Educación*» - 1995).

De ahí que, de manera indirecta, tengamos facilitado el camino para comprender los supuestos multiculturales de sociedad, y desde ellas es cómo se puede llegar a lo que, en términos pedagógicos, se ha denominado *educación personalizada*. Pero además es cómo se puede llegar a una interpretación de las culturas en sociedades múltiples.

Cuando el hombre —puede ser el niño o el adulto— es el *sujeto protagonista* de la educación, se rompen fronteras. Es como podemos concebir un tipo de *escuela abierta* a todo fenómeno cultural, *respetuosa* con su estura social, y *eficaz* para la promoción personal y comunitaria.

El mismo *profesorado*, al realizarse vocacionalmente, o el mismo *centro de enseñanza* sea privado o público, seglar o religioso, tendrá en esa «escuela humana» un dato referencial, que le puede servir, incluso, para un mejor «acoplamiento» en la escuela, y para un «*estímulo*» en su funión educadora. De la misma manera que las sociedades u otras comunidades intermedias —territoriales, eclesiales, benefactoras, etc.— puedan encontrar igualmente resortes suficientes en la *participación y creación*

educativas (V. n. t. «Constitución, democracia y enseñanza religiosa» - 11ª Edición - Ávila 1994).

Al fin y al cabo el *termómetro* de una sociedad, dentro del pluralismo cultural, lo da el *hombre mismo*, que se salva o se pierde en aquella comunidad. Aunque como hombre sea él quien, a través de la escuela, empiece a realizarse y a encontrarse a sí mismo, con su libertad y responsabilidad, en sociedades multiculturales concretas, para el ejercicio de todo el inmenso abanico de derechos humanos. (V. A. Simpson, *Vers une democratie culturell* -Strasbourg 1976).

TIEMPO Y ESPACIO EN BIOQUÍMICA Y MEDICINA *

MARIO SAPAG - HAGAR¹

*Sólo en el tiempo y en el espacio llegamos a ser personas,
tenemos historia, familia, patria, raíces.
Sólo en el tiempo se construye la historia humana. La historia
de nuestra vida es la medida de nuestro tiempo.*

(J. Bayo)

INTRODUCCIÓN

La ciencia moderna constituye una fantástica aventura intelectual de la humanidad que ha explorado desde las siderales dimensiones del macrocosmos hasta la asombrosa pequeñez molecular de los constituyentes del microcosmos biológico subcelular.

La aventura científica misma es una ciencia del movimiento del hombre en el espacio y en el tiempo y el investigador necesita aprender que, sea cual fuere su campo de interés, debe complementar el estudio de las cosas en el espacio con el de los hechos en el tiempo. Picasso, al presentar sus figuras simultáneamente de frente y perfil, introdujo una nueva y dinámica dimensión de tiempo en el estático mundo espacial de la pintura (ej. La Venus del Espejo, 1932). No se contenta el artista sólo con una perspectiva única e inmóvil, sino que con el movimiento introduce una cuarta dimensión, «el tiempo», gracias a la yuxtaposición de colores lisos. Esta misma cuarta dimensión, que se une a las otras tres espaciales (alto, ancho y largo), es esencial para que el científico determine la posición de un fenómeno (teoría de la relatividad).

El espacio, que es la materia prima de las artes, está también perdurablemente vinculado a la Medicina, tanto a través de la geometría tridimensional de los cuerpos sanos y enfermos en que se funda el arte de la mirada médica, como de la anatomía microscópica de lo celular y subcelular. Incluso por ser también una ciencia social, la Medicina incorpora lo dialógico, la muda distancia que expresa relaciones y funda lealtades entre médico y paciente, lo humano por excelencia.

* Conferencia pronunciada el 24 de febrero de 1999.

¹ Profesor Titular y Vicerrector de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile. Miembro de Número de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile. Miembro Correspondiente de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España.

El fenómeno biológico no puede concebirse en plenitud a espaldas del tiempo pues sería sólo una verdad parcial, estática. La Anatomía es estática mientras que la Fisiología es «Anatomía animata». El espacio es la extensión indefinida cuyo protagonista es el límite, en tanto que el tiempo es la duración de los fenómeno y su protagonista es el presente.

En medicina, de haber contado con el cine y la TV, habríamos conocido cómo hacía realmente Hipócrates sus diagnósticos, cómo fue en verdad una lección de anatomía de Vesalio y cómo realizaba Harvey sus experimentos.

La fisiología y el cine tienen un común denominador: ambos se basan en el *movimiento* cuya medida es el tiempo según un antes y un después (Aristóteles). Cuando el cine no se mueve, y sus imágenes espaciales son estáticas, deja de ser cine para convertirse en fotografía; cuando la fisiología deja de ser *local* y *general* (el más grande descubrimiento en la historia de la fisiología fue llegar al concepto filosófico de que la fisiología era la ciencia del movimiento *local*), cuando no hay movimiento de hormonas, de neurotransmisores, de fluidos, de moléculas, de sangre, de gases intraorgánicos, entonces deja de ser fisiología y se convierte en la muerte.

Con Claude Bernard la fisiología alcanzó el estatuto de disciplina fundamental para la medicina, al asentar el concepto de enfermedad en una alteración de la función conquistando así el *tiempo* dentro de dicha concepción, al igual que Virchow, el fundador de la concepción «morfológica», lo hiciera con el *espacio*, creando la «patología celular» al sustentar que todo proceso mórbido tiene un locus o espacio alterado cuya mínima unidad de enfermedad que puede describirse es la célula.

Asimismo, el cine es el único arte que puede representar el curso de una enfermedad (como los radioisótopos y moléculas marcadas para seguir el curso de un proceso molecular en el tiempo). La palabra escrita puede hacerlo en la historia clínica, y la fotografía o la pintura sólo representan el estado de una lesión en un momento determinado. Mas si fuera posible, como lo plantea Martí Ibáñez, seguir con la cámara desde «afuera» el cuadro clínico externo del paciente, y desde «adentro», en lo posible, los cambios fisiopatológicos acaecidos en su organismo, el resultado sería el cuadro de una enfermedad como jamás podría describirse en libro alguno de medicina. Hoy esto ya es una realidad.

Por ser la enfermedad un proceso dinámico que se mueve a través del tiempo, ni la pintura ni la fotografía pueden representarla como el cine y la televisión. Un leucocito, extendiendo el nada amoroso abrazo de sus pseudópodos hacia un microorganismo extraño, lo hace en el espacio pero también en el tiempo; la cicatrización de una úlcera péptica tiene lugar en un espacio limitado pero asimismo en el tiempo; la remisión de un proceso neoplásico se efectúa en un lugar del espacio orgánico pero necesita de tiempo, y solamente el cine o la TV pueden capturar el tiempo, por ser instrumentos dinámicos: la pupila de sus lentes puede mirar durante horas, días y meses un mismo lugar y registrar los cambios acaecidos. (F. Martí Ibáñez).

En el campo de la Bioquímica y de la Biología Molecular, los cambios e interacciones moleculares en el tiempo y en el espacio son de fundamental importancia para la comprensión última de los fenómenos vitales.

Así, el cambio conformacional en el espacio de las moléculas de actina y miosina en el fenómeno de la contracción muscular o el producido por un regulador alostérico en una enzima marcapaso de una vía metabólica, son fenómenos ligados a un tiempo característico de acción, como lo es también la degradación de una proteína en función de su vida media.

El estudio del movimiento incesante de las moléculas dentro de la célula, dirigiéndose hacia sus sitios de acción con una direccionalidad definida y un reconocimiento topográfico específico, configura una vasta tarea para los biólogos moleculares que comienzan a desvelar un apasionante microcosmos subcelular en el tiempo y en el espacio, que compite con la atracción que el tiempo histórico y el espacio geográfico han ejercido desde los albores de la humanidad en el estudio del hombre y de la enfermedad.

Se nos abre así una insospechada visión integrativa de lo que es la vida desde un punto de vista histórico, geográfico, físico y químico.

En esta oportunidad nos referiremos al «*macrotiempo*» o «*tiempo histórico*», es decir, aquel de dimensión prolongada que marca tanto la evolución bioquímica del hombre como su circunstancia bioquímico-histórica y al «*macroespacio*» o «*espacio geográfico*» que lleva a la aparición de determinadas enfermedades o «*patologías geográficas*». También analizaremos las peculiaridades biológicas de los fenómenos que transcurren en un *microespacio* y en un *microtiempo* (tiempo físico).

I. TIEMPO HISTÓRICO (MACROTIEMPO)

1. La evolución bioquímica del hombre

El presente bioquímico-funcional del hombre es producto de su pasado bioquímico, el cual ha ido evolucionando a través de las inexorables modificaciones de la herencia genética (mutaciones), adaptándose a las condiciones del medio exterior por selección natural. Cuando biológicamente —a nivel de genes y enzimas— el hombre no ha tenido tiempo de adaptarse a los cambios que él mismo culturalmente ha provocado, se crean circunstancias bioquímicas que le son fisiológicamente lesivas.

Veamos algunos ejemplos:

1.1. *La reacción de alarma y la movilización energética*

La descarga de adrenalina es una respuesta bioquímico-fisiológica atávica, que, al provocar un alza de la presión sanguínea y un aumento de la glicemia y ácidos grasos circulantes, aseguraba en el hombre primitivo un aporte energético adecuado para su reiterada circunstancia de pelear o huir («to fight or to flight» de Cannon) frente a la presa o al enemigo o su trashumante actividad en busca de alimento. Esta reacción bioquímico-fisiológica se conserva en el hombre moderno pero éste, al responder culturalmente en forma diferente a una ofensa, acción o agresión, no ejercita igual actividad muscular y no consume ese aumento de glucosa y lípidos, lo que favorece la hipertensión y aterosclerosis, de mayor incidencia en el hombre contemporáneo. (Fig.1)

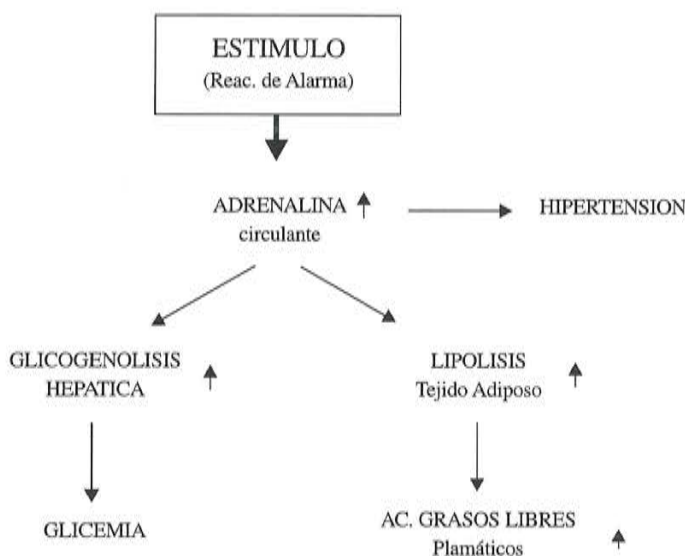


FIGURA 1. *Reacción de alarma y movilización energética.*

1.2. *El paso de la alimentación preagrícola, rica en proteínas, a la agrícola, rica en carbohidratos*

En la dieta fundamentalmente carnívora del hombre primitivo, éste obtenía parte importante de su energía a partir de los aminoácidos de las proteínas.

La introducción en la era agrícola de dietas básicas, pobres cuantitativamente en proteínas y pobres cualitativamente en algún aminoácido esencial, ha sido demasiado reciente en términos de evolución biológica para que el hombre haya podido desarrollar eficaces mecanismos de control a nivel o actividad de las enzimas claves en la degradación de esos aminoácidos vitales para su bienestar, los que hoy millones de hombres queman como insignificante complemento de energía. En suma, biológicamente —a nivel de genes y enzimas— el hombre no ha tenido tiempo de adaptarse a la revolución agrícola, un tiempo notoriamente insuficiente para reinventar la biosíntesis de los aminoácidos esenciales y escaso para adquirir buenos controles de su catabolismo (A. Sols).

La magnitud del desfase se puede resumir así: un hombre típico de 70 Kg. que viva 70 años necesitará para crecimiento neto unos 10 Kg. de proteínas y de hecho requiere unos 1.200 Kg. para sobrevivir los 70 años. De estos 1.200 Kg., aproximadamente una cuarta parte corresponde a pérdidas al exterior, virtualmente inevitables; el 75% restante, ¡unos 900 Kg.!, se gasta —a veces se malgasta— simplemente para proveer energía (Fig. 2).

El catabolismo de los aminoácidos esenciales y su regulación es, concretamente, un campo no sólo de considerable interés teórico sino de gran interés potencial para el bienestar de buena parte de la humanidad, que carece de un aporte suficiente de proteínas, pues podría permitir diseñar mecanismos para ahorrar aminoácidos esenciales.

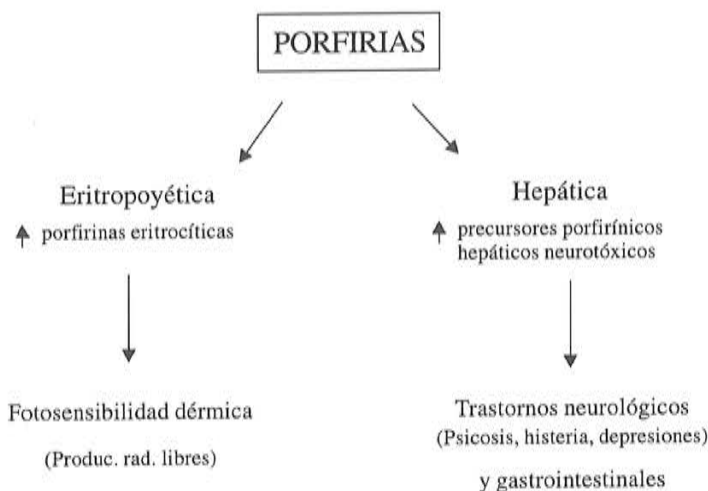


FIGURA 5.

II. MACROESPACIO (ESPACIO GEOGRÁFICO)

1. La Anemia drepanocítica o falciforme

Estos pacientes poseen una hemoglobina anormal (HbS) que en su forma desoxigenada tiende a precipitar en el glóbulo rojo, deformándolo, acortando su vida media y produciendo su destrucción, lo cual lleva a que el *Plasmodium falciparum* de la malaria no pueda cumplir su ciclo vital intraeritrocito. Así, la frecuencia del gen HbS falciforme en África queda restringida a las regiones donde la malaria es una causa principal de muerte, pues el heterocigoto está protegido contra la malaria y no sufre la enfermedad falciforme, en tanto que el homocigoto normal es vulnerable a la enfermedad (Fig. 6).

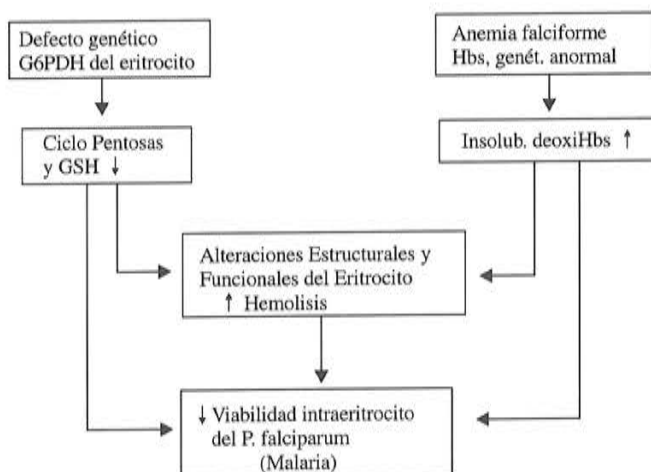


FIGURA 6. Defectos genéticos de alta frecuencia (G6PDH, HbS), ventajosos bajo ciertas condiciones ambientales (Malaria).

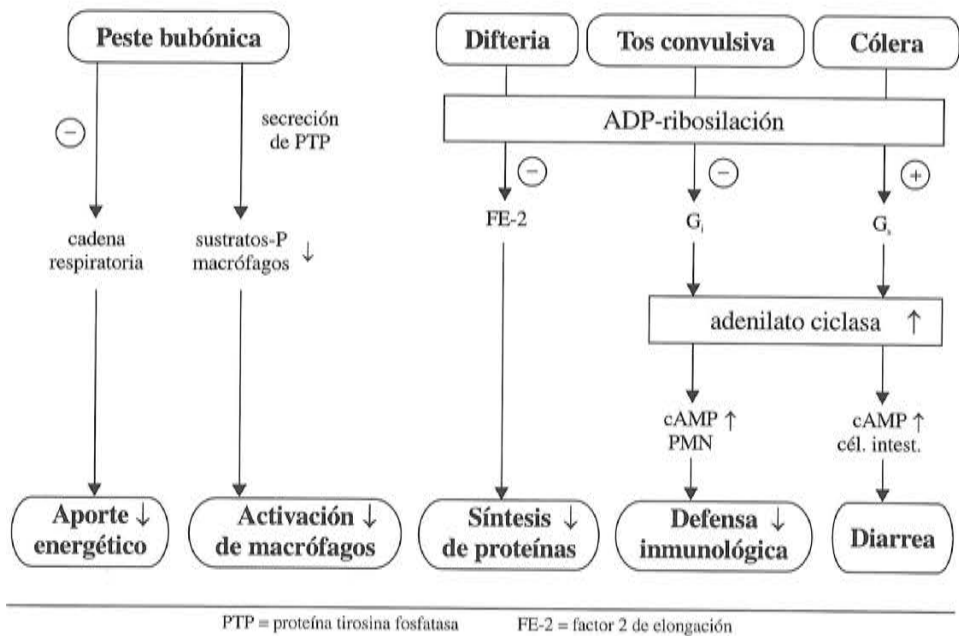


FIGURA 4. *Toxinas Microbianas.*

marcó así la historia a través de la circunstancia bioquímica que afectó a estas dos personalidades.

La tos convulsiva: La toxina de la *Bordetella pertusis* también provoca daño al ser humano por ADP-ribosilación de una proteína transdutora G_i de la membrana celular, con lo que sube el nivel de AMP cíclico en los leucocitos polimorfonucleares bajando la capacidad de defensa inmunológica de éstos.

El cólera: La toxina del cólera produce trastornos intestinales también por ADP-ribosilación, pero en este caso de una proteína transdutora G_s de la membrana celular intestinal haciendo subir el nivel intracelular del AMP cíclico, lo cual produce la diarrea y el consiguiente desequilibrio hidroelectrolítico.

2.2. *Porfiria hepática*

En esta enfermedad hereditaria, la excesiva actividad de la enzima d-aminolevulinó sintetasa (ALA-sintetasa), lleva a una elevada síntesis de uroporfirinas y coproporfirinas que producen una gran variedad de síntomas, incluyendo trastornos mentales, como ocurrió con Jorge III, Rey de Inglaterra, quien provocó, con su irracional imposición de impuestos a las colonias americanas, una circunstancia histórica que aceleró la independencia de los EE.UU. de N.A. (Fig. 5).

2. La carencia de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el favismo

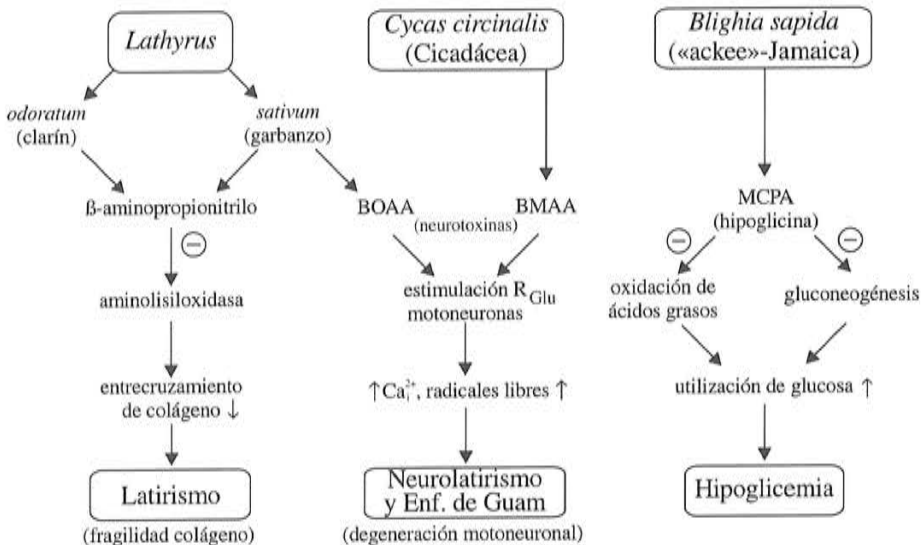
La incapacidad de mantener niveles intraeritrocíticos suficientes de glutatión reducido (GSH) lleva a inestabilidad del glóbulo rojo, que se hemoliza por acción de fármacos (primaquina) o sustancias contenidas en los alimentos, por ej. en las habas (favismo), que Pitágoras prohibía comer a sus seguidores pues él sufría de esta afección. También en este caso disminuye la viabilidad intraeritrocito del *P. falciparum* (malaria).

3. Geografía y toxinas vegetales

Son numerosas las toxinas provenientes de vegetales que están circunscritas a cierta áreas geográficas, lo cual explica la distribución de sus manifestaciones patológicas en determinadas zonas o países.

La Fig. 7 ilustra los casos de latirismo, neurolatirismo-Enfermedad de Guam y de hipoglicemia («ackee» - Jamaica), así como las toxinas vegetales que los producen.

Otros ejemplos de patologías ligadas a situaciones geográficas (geopatologías) son las carencias de oligoelementos en suelos y agua, tal como la cardiomiopatía por carencia de selenio en la región china de Keshan y en el este de Finlandia (el Se forma parte de la enzima glutatión peroxidasa, importante para impedir la lipoperoxidación). Otro ejemplo lo constituye la carencia de yodo en suelos montañosos de Chile y Suiza (trastornos tiroideos).



BOAA = β-N-oxalilamino-L-alanina

BMAA = β-N-metil-amino-L-alanina

MCPA = L-(metilenciclopropil)alanina

FIGURA 7. Geografía y toxinas vegetales.

4. Síndrome de la serotonina o del sharav

La disminución de los iones pequeños negativos del aire, en zonas geográficas caracterizadas por determinados vientos cálidos (sharav, foehn, Santa Ana, etc.), que se desplazan sobre grandes masas de arena o montañas, hace disminuir la actividad de la enzima MAO-dependiente de Mn, que degrada a la serotonina, que se acumula produciendo trastornos intestinales y de la visión, depresión e irritabilidad, etc., situación que se previene farmacológicamente con metisergida, un bloqueador de los receptores de serotonina (Fig. 8).

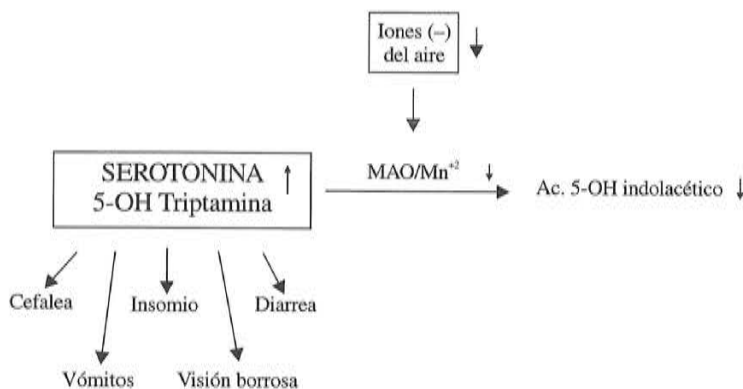


FIGURA 8. *Reacción de alarma y movilización energética.*

III. MICROESPACIO

Al llevar nuestra atención hacia niveles celulares y subcelulares observamos que la concepción espacial es fundamental para comprender los fenómenos que allí ocurren: los desplazamientos y proyecciones de un fagocito o una ameba ocupando nuevos microespacios, explican la fagocitosis. Por otra parte, el cambio conformacional que adquiere una proteína por desplazamiento de sus átomos, produciendo una nueva forma y ocupando un microespacio diferente, nos permite entender su capacidad de reconocimiento y su interacción con otras proteínas, la activación de una enzima por un regulador alostérico, con la consiguiente activación o inactivación de una vía metabólica, etc. Del mismo modo, la epigénesis molecular, por reconocimiento e interacciones sucesivas de proteínas, va creando formas de complejidad creciente. Ejemplo: la formación de la subunidad ribosomal pequeña por interacción de más de 20 proteínas diferentes en un orden secuencial específico.

La forma de las moléculas en el espacio y su organización, no la sustancia material misma, es lo esencial y funcional de ellas.

Muchas veces, a diferentes conformaciones corresponden distintos niveles de actividad. Por ejemplo, las diferentes conformaciones que adquiere la calmodulina por niveles crecientes de Ca^{2+} intracelular, se traduce en diferentes reconocimientos y activaciones de algunas enzimas reguladas por el complejo Ca-calmodulina. Análogos cambios espaciales experimentan las proteínas por interacción con moléculas regula-

doras pequeñas (moduladores alostéricos) o por modificaciones covalentes (fosforilación, etc.). Son estos cambios espaciales de las moléculas receptoras de señales de la célula los que explican los consiguientes fenómenos de transducción que se producen por interacciones moleculares que culminan con la acción o respuesta celular adaptada a esa información.

Recientemente, la bioquímica molecular ha concentrado también su atención en el tráfico molecular subcelular, buscando la explicación de los espacios recorridos por determinadas moléculas y el reconocimiento por éstas de sus destinos precisos. Por ejemplo, ¿qué es lo que determina que las proteínas de la membrana celular, una vez sintetizadas en los ribosomas, se dirijan a ocupar un determinado sitio en dicha membrana?

Esta translocación dirigida está, en gran medida, determinada por la lipomodificación de las proteínas, las que, una vez lipoaciladas o preniladas, se hacen más hidrófobas para poder ser así aceptadas por la capa bilipídica de la membrana celular. Esto queda ilustrado por la lipoacilación y prenilación, respectivamente, de las subunidades $G\alpha$ y $G\gamma$ que forman parte de las proteínas transductoras G de la membrana (Fig. 9). De la misma manera, las proteínas kinasas se translocan de un compartimento celular a otro según sean los segundos mensajeros producidos durante la actividad en la célula, los cuales determinan cambios conformacionales que permiten la unión de la kinasa a una u otra proteína específica de anclaje subcelular (Fig. 10). Igualmente, las distintas formas de una enzima (isoenzimas) se unen a distintas zonas de reconocimiento subcelular para ejercer allí su acción.

Es interesante también señalar que el paso o transducción de un efecto o estímulo físico (presión, etc.) a un efecto bioquímico molecular se lleva a cabo por cambios de espacialidad. Así, al ejercer presión en un tejido se de forma la matriz extracelular y las moléculas de fibronectina de ésta cambian conformacionalmente, cambio que es

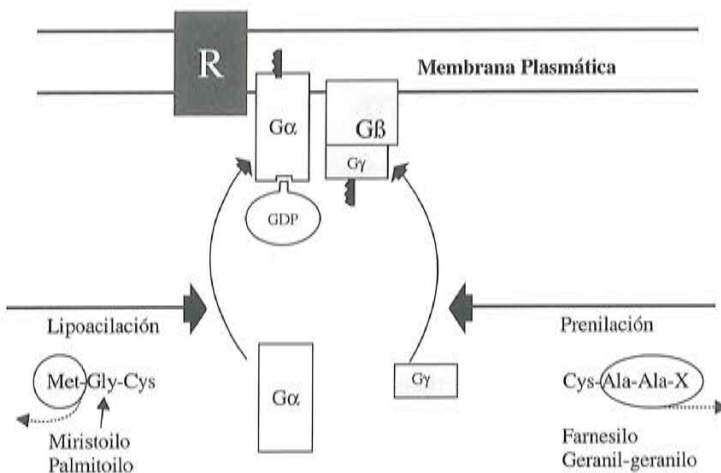


FIGURA 9. Ejemplo de Tráfico Subcelular Translocación dirigida de Proteína G por Lipomodificación.

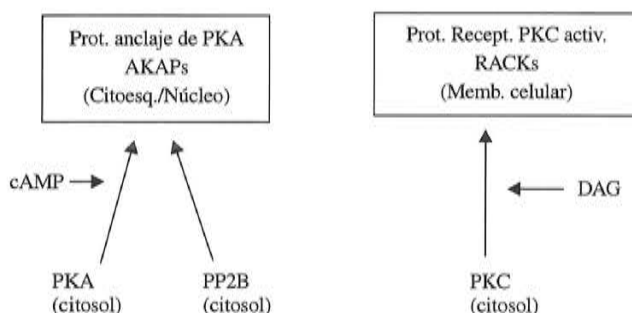


FIGURA 10. *Translocación de Proteínas Kinasas.*

reconocido por las moléculas de integrina de la membrana celular, las cuales cambian a su vez su conformación especial, lo que lleva a una modificación del citoesqueleto al que están conectadas.

La anatomía ha pasado a ser molecular y lo mismo la patología. Podemos explicar el cambio de forma característico del glóbulo rojo en la anemia falciforme por la alteración molecular de la Hb y también la hipertrofia e insuficiencia cardíacas que siguen a la hipertensión. En este último caso los cambios en la microarquitectura de los elementos locales de respuesta en la célula cardíaca (cardiomiocito) se traducen en espaciamientos subóptimos entre moléculas receptoras adyacentes, es decir, entre los canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridina de los túbulos-T (DHPRs) y los canales intracelulares de Ca^{2+} sensibles a rianodina (Ry R). Esto hace que el pequeño aumento de Ca^{2+} intracelular local en los túbulos-T (que por apertura de sus canales DHPR ingresan Ca^{2+} extracelular tras el cambio del potencial de acción) no alcance, por la mayor distancia a los canales sensibles a rianodina del retículo sarcoplásmico, a estimular la salida de suficiente de Ca^{2+} desde éste como para constituir una «chispa» (*spark*) de Ca^{2+} local, con el consiguiente acoplamiento excitación-contracción (EC) deficiente o alterado que caracteriza a la hipertrofia e insuficiencia cardíacas. En cambio, en el corazón normal, por existir un espaciamiento óptimo y sin alterar el Ca^{2+} citosólico global se desencadena una contracción óptima. (Fig. 11)

IV. MICROTIEMPO (TIEMPO FÍSICO)

El tiempo, cuarta dimensión de los fenómenos biológicos, no ha sido aún integralmente analizado en el contexto del mundo subcelular y molecular.

Las moléculas llevan en sí información espacial pero también temporal pues tienen, dentro del concierto celular, una vida media determinada. Así, las moléculas de las proteínas duran más o menos tiempo según su estructura molecular y, más específicamente, su aminoácido N-terminal. La Tabla 2 muestra cómo, según cuál sea dicho aminoácido, una proteína citosólica tiene una vida media de 2-3 minutos o de más de 20 horas.

Igualmente, al considerar el «pool» de aminoácidos producidos al degradarse las proteínas, las K_m de las enzimas, que llevan al catabolismo de los aminoácidos o a la síntesis de proteínas, determinan la preferencia a la utilización de los aminoácidos

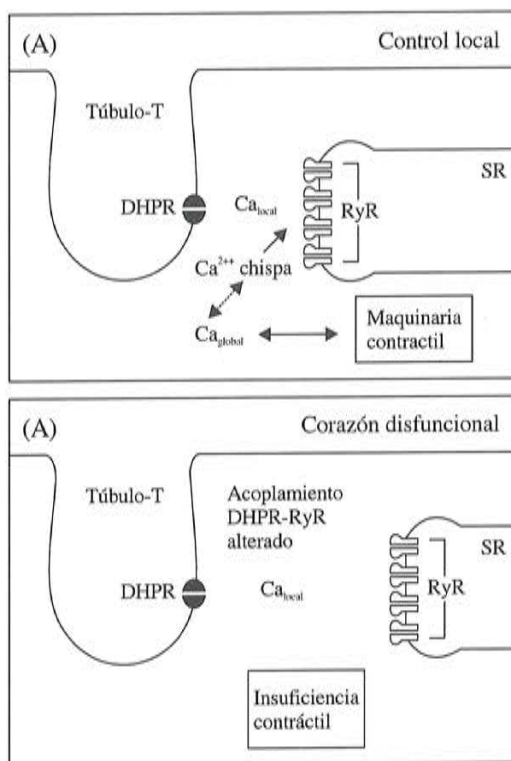


FIGURA 11. Acoplamiento excitación-contracción en el corazón normal (A) y disfuncional (B). [A.M. Gómez et al., *Science* 276:800-806 (1997)].

como fuente energética o como unidades de resíntesis de proteínas, respectivamente. Así, si la concentración de aminoácidos es baja, se privilegiará la síntesis de proteínas (Km baja). Su velocidad de utilización queda, pues, preferentemente determinada según su concentración y las características cinéticas intrínsecas de las enzimas implicadas (Fig. 12).

Otro ejemplo de la relevancia del microtiempo y de los parámetros cinéticos lo constituye el sistema de transducción para el receptor β -adrenérgico de la adrenalina, que lleva a la producción del 2º mensajero AMP cíclico el cual conduce a la producción de sustratos energéticos, como glucosa a partir de glucógeno y ácidos grasos a

<i>Estabilizadores</i> (>20 Horas)	<i>Desestabilizadores</i> (≈ 30 - 7 min.)	<i>Muy desestabilizadores</i> (≈ 3 - 2 min.)
Metionina	Isoleucina	Leucina
Glicina	Glutamato	Fenilalanina
Alanina	Tirosina	Aspartato
Serina	Glutamina	Lisina
Treonina	Prolina	Arginina
Valina		

TABLA 2. Vida media de las proteínas citosólicas en función de su aminoácido N-Terminal.

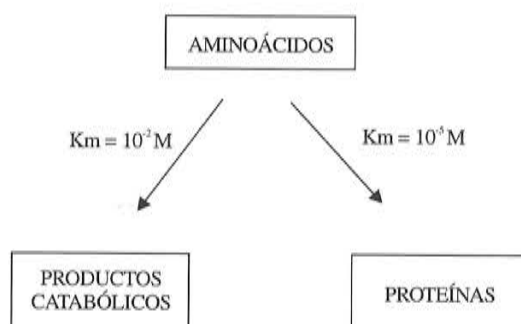


FIGURA 12.

partir de los triglicéridos del tejido adiposo. En este caso la mayor velocidad de acción de la adenilato ciclasa en relación a la actividad GTPásica de la proteína transductora Gs, que revierte la dirección de la transducción, asegura que siempre, aún con bajos niveles de adrenalina o una pronta eliminación de ésta, se produzca una respuesta inicial (Fig. 13).

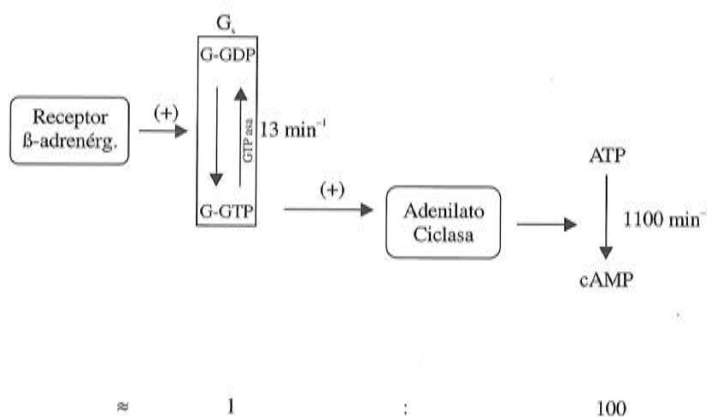


FIGURA 13. Ejemplo de la relevancia fisiológica de los parámetros cinéticos.

Queda aún mucho por avanzar en el estudio integrativo de las acciones múltiples que ocurren en el tiempo y en el espacio en la célula, para poder comprender cómo el incesante tráfico de moléculas intracelulares ejerce su acción coordinadamente en el sitio y momento precisos y con la duración adecuada.

Es muy probable que con el tiempo asistamos al reconocimiento de enfermedades moleculares por alteraciones o disfunciones direccionales, espaciales, espacio-temporales, epigenético moleculares, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Bachmair A, et al. «In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue». *Science* **234**, 179-186 (1986).
- Bernard C. «Lectures on the Phenomena of Life Common to Animals and Plants». Springfield, Ill. Charles C. Thomas (1974)
- Casey PJ. «Protein Lipidation in Cell Signaling». *Science* **268**, 221-5 (1995).
- Eaton, S.B. & Konner, M «Paleolithic Nutrition» *N. Engl. J. Med.* **312** (5)283-9 (1985).
- «El Espacio en las Ciencias» Consejo de Rectores de las Universidades Chilenas. Edit. Universitaria, Santiago (1982).
- «El Tiempo en las Ciencias» Consejo de Rectores de las Universidades Chilenas. Edit. Universitaria, Santiago (1981).
- «El Tiempo, Cuarta Dimensión de la Medicina» Documenta Geigy, Basilea (1970).
- Faux M, Scott J. «Molecular Glue: Kinase Anchoring and Scaffold Proteins». *Cell* **85**, 9-12 (1996).
- Gómez AM, et al. «Defective Excitation-Contraction Coupling in Experimental Cardiac Hypertrophy and Heart Failure». *Science* **276**, 800-806 (1997).
- Inagaki, N. et al «Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities» *TIBS* **19**, 448-452 (1994).
- Jacob F. «El ratón, la mosca y el hombre». Grijalbo Mondadori S.A. Barcelona (1998).
- Jacob F. «La lógica de lo viviente». Ed. Universitaria, Santiago (1973).
- Marinovic M. «Espacialidad Humana y Arte». Ed. Dpto. Técnico Investig. Univ. de Chile, Santiago (1992).
- Martí Ibañez F. «El fabuloso ojo de la cerradura». *MD en español* **5**(7)5-17(1967).
- Mochly-Rosen D. «Localization of Protein Kinases by Anchoring Proteins: A theme in Signal Transduction». *Science* **268**, 277-251 (1995).
- Monod J. «El Azar y la Necesidad» Ed. Orbis, Bs. Aires (1985).
- Picasso Colección «Entender la Pintura». Ediciones Orbis S.A. Bs. Aires (1994).
- Sapag-Hagar M. « La Circunstancia Bioquímica y Patológica del Hombre». *Rev. Col. Quim. Farmacéut. de Chile* **45**(3) 74-8 (1989).
- Sapag-Hagar M. « La Unidad Bioquímica del Hombre». *Rev. Col. Quim. Farmacéut. de Chile* **34**, 7-17 (1978)
- Sapag-Hagar M. «Importancia de la Biorregulación Celular en la Patología Humana». Cuadernos Universidad de Chile N° 4 p. 15-22 (1985) Edit. Universitaria, Santiago.
- Sapag-Hagar M. «Ciencia, Evolución y Ética: de la Herencia Biológica a la Herencia Cultural». *Anales Acad. Alfonso Leng* **9**, 37-41 (1991).
- Schroedinger, E. «Ciencia y Humanismo», Tusquets Editores, Barcelona (1985)
- Sigerist HE. «Civilización Enfermedad». Fondo de Cultura Económica. México (1946).
- Sols A. «Deficiencia de Proteínas en el Hombre. Consideraciones de un Bioquímico en la Década de los Setenta». Primer Congreso FESBE, Octubre 1976, España.
- Stryer L. «Biochemistry», W.H. Freeman and Co., New York, 3rd Ed. (1988).
- Teilhard de Chardin «El Fenómeno Humano», Ed. Taurus, Madrid (1965).

DE NUEVO LA HISTERIA DE LA LISTERIA (*L. monocytógenes*)*

GUILLERMO SUÁREZ FERNÁNDEZ

INTRODUCCIÓN

En ese grupo de enfermedades emergentes que podríamos considerar como «enfermedades de la civilización» la Listeriosis viene a ser la enfermedad modelo por excelencia entre los procesos infecciosos del máximo interés actual.

El nombre de Listeriosis se aplica a la enfermedad producida por microorganismos del género *Listeria*, principalmente *L. monocytógenes*, en el hombre y los animales, que se caracteriza por una iniciación febril y septicémica y en el curso de la cual aparecen una serie de signos patológicos, como hiperglucemia, mononucleosis (monocitosis), necrosis hepática focal, aborto, encefalitis, endocarditis y necrosis de miocardio, queratitis y mastitis. Estas manifestaciones están claramente diferenciadas y distribuidas por especies de acuerdo con la fisionomía patológica y estado fisiológico. En el hombre puede cursar de forma inaparente o con síntomas leves y pasar desapercibida mientras que en la mujer gestante puede originar abortos o infección neonatal.

ETIOLOGÍA

Existen seis especies dentro del género *Listeria*: *L. monocytógenes*, *L. ivanovi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi* (subsp. *grayi* y *murrayi*).

Las listeriosis humanas son producidas exclusivamente por *L. monocytógenes* y los animales por *L. monocytógenes* y *L. ivanovi*, siendo más importante la primera.

Ciertos grupos de individuos son más susceptibles de adquirir la Listeriosis. Estas personas de alto riesgo incluyen mujeres gestantes, recién nacidos, adultos bajo tratamiento inmunológico, ancianos, pacientes hemodializados, enfermos alcohólicos, drogadictos, etc.

* Conferencia pronunciada el 10 de noviembre de 1999.

LISTERIOSIS Y CONTAMINACIÓN ALIMENTARIA

No deja de ser un hecho paradójico que en aquellos países más avanzados en los diferentes planos económico, social, académico y sanitario, se hayan incrementado las infecciones humanas de origen alimentario.

El hecho ha venido preocupando a la Organización Mundial de la Salud, siendo uno de los problemas de índole sanitaria más característicos del mundo contemporáneo.

Constantemente aparecen agentes etiológicos nuevos, susceptibles de transmisión por alimentos, tales como **Vibrio vulníficus**, **Plesiomonas shigelloides**, **Aeromonas hydrophila**, **Edwardsiella tarda**, **Cryptosporidium parvum**, **E. coli 0157 H7** y **Listeria, monocytógenes**, entre otros.

El ejemplo de la Listeriosis es particularmente importante por la serie de brotes infecciosos a lo largo de las décadas de los 80 y 90 en Nueva Escocia (Canadá), Massachusetts, California y Filadelfia (USA), Canton de Vaud (Suiza), Londres (Gran Bretaña), Limousin, Alsacia, Vendeé, Ile de France, Normandía (Francia). En el año 1992 se detectaron en Francia más de 300 casos apareciendo de nuevo en 1993, si bien en este brote la enfermedad fue rápidamente controlada y las personas afectadas no llegaron al medio centenar. Tras unos cinco años de silencio, en 1998 aparece en USA una importante epidemia que afecta a 14 estados con centenares de enfermos.

En la epidemiología de este proceso llaman la atención la circunstancia de su presentación en países de alto nivel social y el alto grado de letalidad que se halla en torno al 30 por cien, con variaciones mínimas para los distintos focos y serotipos de **L. monocytógenes**.

Naturalmente, hay que hablar de miles de bajas humanas por la enfermedad en la pasada década y el impacto sanitario de este proceso se resume en la frase acuñada por la prensa americana como «histeria de la listeria» (Suárez, G., Anales de la Real Academia Nacional de Medicina, **108**, 1991).

NUEVOS MODOS DE VIDA Y ENFERMEDAD

Existen una serie de patologías de aparición reciente, relacionadas con las formas de vida actuales y que afectan con preferencia a determinados campos (alimentación, toxicología, drogadicción, residuos y medio ambiente, etc).

Limitándonos ahora al área de los alimentos, el problema, aunque aparentemente paradójico, se asienta sobre unas razones de base con una fuerte interrelación y que J. L. Cox (Food Technology **43**, 1989) las enumeraba así:

- a) Cambios en los hábitos alimentarios.
- b) Avances en el estudio epidemiológico.
- c) Modificaciones demográficas.

- d) Inmigración y turismo.
- e) Producción de materias primas a gran escala.
- f) Perfeccionamiento de la tecnología alimentaria.
- g) Modificación del comportamiento de los microorganismos.

El apartado a) es quizá el más evidente.

La vida actual exige celeridad, rapidez, economizar tiempo en aras de una mayor competitividad laboral y actividad lúdica y ello ha traído nuevas formas de alimentarse (platos precocinados, semiconservas, alimentos deshidratados, restauración por «catering», etc).

Es decir, hemos pasado de una cocina clásica, bien conocida por regiones, típica y muy apreciada desde un punto de vista gastronómico, pero de laboriosa ejecución, a una nueva manera de nutrirse quedando los platos tradicionales poco menos que restringidos para celebraciones o festividades.

En un plato precocinado, con varios substratos, mezclados o separados, con diferentes valores de pH, humedad, actividad acuosa, nutrientes, vitaminas, microfactores diversos, es más fácil que progrese una contaminación microbiana por la simple posibilidad de encontrar un medio idóneo para que un determinado microorganismo pueda multiplicarse.

La reconstitución de alimentos desecados, la interrupción de la cadena de frío, son también factores de riesgo, evidentemente.

Respecto a los otros puntos relacionados, podríamos considerar que el tratamiento de datos epidemiológicos por ordenador y la posibilidad de compaginar este aspecto con un diagnóstico más rápido y exacto, ya supondría un registro más elevado; que el envejecimiento de la población modifica la fisonomía patológica humana; que la inmigración y el turismo favorecen la difusión de determinados procesos infecciosos; que la producción de materias primas a gran escala facilita la creación de nuevos nichos ecológicos para los microorganismos; que el empaquetado, envasado al vacío, refrigeración y congelación afectan a la supervivencia y multiplicación de los gérmenes.

Finalmente, el cambio de conducta de los agentes microbianos es un hecho muy importante y se explica porque muchos de los factores de patogenicidad están codificados por plásmidos que pueden transmitirse de unas especies de microorganismos a otras diferentes.

Naturalmente que, ante este cúmulo de circunstancias, la industria, la administración, los organismos sanitarios, no permanecen inactivos, y ahí están aplicándose a nivel industrial y de consumo, sistemas de limpieza en circuito cerrado, análisis de riesgos y control de puntos críticos, los códigos de buenas prácticas, la inspección y análisis de alimentos en las distintas fases, desde el origen hasta el consumo, las reuniones científicas, propiciadas por diferentes organismos sanitarios, y como ejem-

pló nos complace citar la Conferencia Consenso sobre Listeriosis auspiciada por el Ministerio de Sanidad y Consumo y que tuvo lugar en la Facultad de Veterinaria de León en Octubre de 1992, presidida por el Sr. Decano Prof. Rodríguez Ferri.

No será aventurado predecir que ese mayor riesgo de la alimentación moderna tiene que declinar, y así se está comprobando, a medida que el conocimiento de los mecanismos de contagio y de prevención se mejore y se adquiriera una mayor experiencia.

LA LISTERIOSIS COMO MODELO

Es, sin duda, la Listeriosis el proceso infeccioso de origen alimentario de mayor interés actual y, en consecuencia, el más intensamente estudiado en los últimos años. Como prueba diremos que se han ensayado unas treinta técnicas modernas de diagnóstico microbiológico con el fin de lograr una detección rápida y precisa de la enfermedad entre las que destacan PCR (reacción de polimerasa en cadena), citometría de flujo, sondas genéticas, distintos tipos de electroforesis (enzima multilocalizado, impulso de campo), espectrometría de masas, análisis de secuencias y perfiles nucleotídicos, etc.

La epidemiología de la Listeriosis se explica por el propio ciclo ecológico de *Listeria monocytógenes*, germen de origen telúrico y de gran ubicuidad.

Al hombre llega el microorganismo por vía alimentaria a través de alimentos vegetales, de origen animal (carne y leche), pescados y mariscos, estos contaminados en el medio acuático.

En España la Listeriosis humana no ha constituido, hasta el momento presente, un problema importante, con contados focos y escaso número de afectados (Valencia, 1990, de carácter ginecológico; Las Palmas, 1991, de origen alimentario), en contraste epidemiológico con la vecina Francia.

Las epidemias francesas fueron producidas por estirpes de *L. monocytógenes* diferentes y los alimentos implicados eran respectivamente, fiambre de lengua de cerdo en gelatina (1992) y «rilletes», productos de charcutería a base de grasa de cerdo (1993).

La escasa presentación, en nuestro país, de casos de Listeriosis humana no concuerda con la relativa frecuencia con que se ha venido diagnosticando en la esfera animal, principalmente en ganado ovino, ni con la asiduidad con que se ha aislado *L. monocytógenes*, en nuestro laboratorio, de diversos alimentos (Fernández, J. *et al.*, 1986, en «Listeriose». Edit. A.L. Courtieu. Université de Nantes).

Es de destacar, sin embargo, que ya con anterioridad a la década de los 80, en que aparecen numerosos focos de Listeriosis humana en USA y Europa, existían centos españoles en los que se estudiaba la enfermedad, aportando importantes contribuciones científicas muy oportunamente (Departamento de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal de Madrid; Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense).

A partir del descubrimiento de la bacteria por Murray y colaboradores en los años 20 (Murray, E.G.D. *et al.* 1926 Jour. Bacteriol. Pathol. 29) como causa de una epidemia en los conejos y cobayos en el animalario de la Universidad de Cambridge, la enfermedad se ha venido considerando, por largo tiempo, como un proceso típicamente animal, pero a partir de la década de los 80, en que aparecen numerosos brotes humanos, en todos los hemisferios, **L. monocytógenes** merece la calificación de patógeno oportunista, con un elevado potencial mesofílico de virulencia tanto para los animales como para el hombre.

No obstante existe, claramente diferenciadas, unas dominantes patológicas por especies, y así la monocitosis y la hepatitis con necrosis focal son propias de los roedores, mientras que el aborto y las encefalitis se presentan en ruminantes. En el hombre predominan también las formas encefalíticas o con sintomatología de meningitis cerebroespinal o parálisis bulbar, y en la mujer gestante los abortos o infección neonatal, si bien la mayoría de las veces puede cursar de forma inaparente o con síntomas leves.

ENFERMEDAD CREADA POR EL HOMBRE

Si bien **L. monocytógenes** resiste mejor a las condiciones naturales del medio ambiente que la mayoría de los microorganismos no esporulados y puede multiplicarse en un amplio intervalo de temperatura, actividades de agua y grado de acidez, estando en posesión de factores de virulencia extremadamente complejos, es lo cierto que, hasta épocas recientes, no había producido serios trastornos en el área de la salud pública.

¿Qué alimentos han sido responsables de las epidemias humanas mencionadas?

En Canadá, 1981, la causa fue el consumo de ensalada de col o «coleslaw». En Massachusetts, 1983, leche pasteurizada; en California, 1985, queso; en Filadelfia, 1986, queso y helados; en Suiza, queso blando; en Inglaterra, 1987, el alimento contaminado fue el paté; en Francia, 1992 y 1993, fiambre de cerdo y preparados de charcutería con grasa de porcino y en USA, 1998 y 1999, el brote de Listeriosis se debió a la contaminación de «perros calientes» de origen industrial (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 1999).

Una de las causas de contagio más frecuentes en los animales es el uso de ensilado en la alimentación. Cuando la acidificación del producto es insuficiente, **L. monocytógenes** puede proliferar extensamente.

El ensilado también es un producto artificial creado por el hombre y resulta insustituible como alimento para los ruminantes domésticos en el periodo de estabulación.

Un eminente listeriólogo de la Universidad de Würzburg, H. Seeliger (Curso de Verano Complutense de Almería, 1991) se preguntaba si la Listeriosis no es una enfermedad creada por el hombre. En efecto, si los principales brotes en el ganado se deben al consumo de ensilaje contaminado y en el hombre al consumo de productos de origen animal sometidos a un complejo proceso de transformación, tendríamos que reconocer que las epidemias descritas no hubiesen tenido lugar con una alimentación

a base de productos naturales, ni siquiera refrigerados, puesto que *L. monocytógenes* se multiplica a la temperatura de 4° C, que es la normal en un frigorífico.

Es como si los avances propios de la civilización ofreciesen oportunidades a esta bacteria, omnipresente en cualquier sustrato orgánico y en posesión de complejos mecanismos enzimáticos que posibilitan su acción patógena en determinadas circunstancias.

Es evidente, sin embargo, que el riesgo actual de infección por *Listeria* puede minimizarse con una serie de normas higiénicas tal y como recomienda, por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud y que estas grandes epidemias a que nos hemos venido refiriendo acabarán por desaparecer.

Ahora bien, en nuestra opinión, podría llegarse a una situación de declinación de representación asintótica, compatible con un aceptable grado de salud humana, pero no a erradicar totalmente las infecciones por *Listeria* de carácter natural y nivel esporádico. No olvidemos la amplia gama de posibilidades patogénicas de *L. monocytógenes* y su don de la ubicuidad.

En otras palabras, creemos que se llegarán a controlar temibles epidemias en el momento actual, como la hepatitis o el SIDA, pero no los casos o brotes aislados de Listeriosis.

TERMORRESISTENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA

La termorresistencia es un viejo tópico activado por la epidemia de Massachusetts en 1983, aparentemente producida por el consumo de leche pasteurizada (Suárez, G., 1989, Acta Microbiol. Hungar. 36).

Nuestra amplia experiencia en el tema, tanto a escala de laboratorio como a nivel industrial, nos permite establecer que un proceso de pasterización normal o correcto es suficiente, generalmente, para destruir las listerias, siempre que el número de estos microorganismos no sea muy elevado (superior a 10^5 por ml., como mínimo). Estas cantidades elevadas no suelen encontrarse normalmente en la leche. Por tanto, solamente cuando se alimentan animales con ensilaje contaminado o en caso de mastitis producidas por *Listeria* puede existir un riesgo cierto. En este caso la relación de calentamiento tiempo/temperatura de 71,7° C durante 15 segundos, que es el mínimo exigido, no sería suficiente para garantizar una pasterización correcta (Fernández-Garayzabal, J.F., 1994. Tesis Doctoral).

En este supuesto, el peligro resulta evidente, ya que las Listerias pueden reparar un posible daño término a temperaturas de refrigeración (4° C), lo que no ocurre con Salmonella, por ejemplo.

PATOGÉNESIS MOLECULAR

La investigación en torno a la patogénesis molecular del género *Listeria* está en alza, lo que se debe a la confluencia de una serie de factores tales como la epidemia

reciente extendida a 14 estados en USA con centenares de bajas por listeriosis, así como a la retirada del mercado de quesos frescos en Francia y España y el consiguiente convencimiento de la posible reemergencia periódica de la enfermedad unido a su difícil erradicación.

De otra parte, *Listeria* se ha utilizado ya con gran éxito experimental como vector de antígenos protectores contra otras bacterias (*Salmonella* y *Legionella*), virus (CDV o virus del moquillo) y patologías de origen, *a priori*, no infeccioso, como son el carcinoma colorectal y el carcinoma renal (Dietrich et al. 1998, Nat. Biotech, **16**).

Paralelamente, un Consorcio Europeo formado por 10 laboratorios, cinco alemanes, dos franceses y tres españoles (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM, Hospital Ramón y Cajal, Fac. de Veterinaria UCM, que coordina a los grupos españoles) están secuenciando el genoma de *Listeria monocytógenes*, lo que va a lanzar una nueva luz sobre el conocimiento de los mecanismos de virulencia de una bacteria intracelular facultativa de las características patogénicas de *Listeria*, que reúne características óptimas como modelo de estudio.

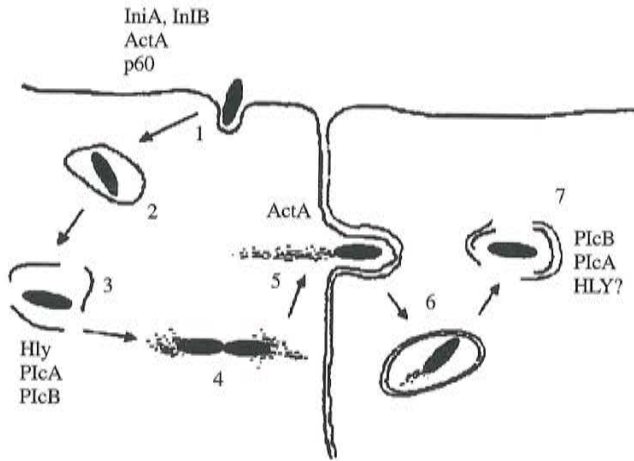
INVASIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS

El enorme interés suscitado por este fenómeno se debe a que es el primer paso de la infección bacteriana y, por tanto, la diana perfecta para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos. El conocimiento de las moléculas que determinan el biotropismo bacteriano puede utilizarse para dirigir nuevos fármacos o vacunas hacia el lugar del organismo donde su efecto sea óptimo.

Dentro del género *Listeria* se ha venido a denominar a la familia de proteínas relacionadas con la invasión Internalinas, a las que se les está denominando en orden alfabético en función de su descubrimiento. Las internalinas de *Listeria* se dividen en dos grandes grupos: las ancladas a la superficie bacteriana y las que se secretan al medio. La primera internalina descubierta y mejor caracterizada hasta el momento es la Internalina A (InIA.). Esta proteína está anclada a la superficie de *Listeria* y ha conferido, en cultivos celulares, invasividad a *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* e incluso, a bolitas de látex tapizadas con proteína (Lecuit et al., 1997, Infect. Immun. **65**). La caracterización de esta internalina ha llegado hasta el punto de que su molécula receptora en la célula eucariota, la E-caderina, ha sido identificada. Esta proteína es una glicoproteína transmembrana que media la unión intercelular dependiente de calcio. Curiosamente, en la mucosa intestinal del hospedador (origen de la infección por *Listeria*) la E-caderina no se localiza en la cara apical de los enterocitos, sino en su cara basolateral, sugiriendo que, como en el caso de *Shigella*, *Listeria* invade primero las células M del intestino, y penetra ulteriormente las células intestinales lateralmente (Ireton, Ketal. Cell. Biol. **10**, 1998). Actualmente se están haciendo enormes esfuerzos por determinar también el receptor celular de InIB, que, además de estar anclada la proteína a la superficie de la bacteria es secretada al medio. En experimentos realizados con InIB purificada añadida de forma exógena al medio de cultivo, se adhiere a la superficie de *Listeria innocua*, transformando esta bacteria, que no es invasiva, en un microorganismo capaz de penetrar células no fagocíticas (Müller et al, 1998. Infect. Immun. **66**).

La internalina H (InIH) ha sido la última descrita hasta el momento en **Listeria monocytógenes**. Esta internalina está integrada en un *locus* conjuntamente con las internalinas G y E. La eliminación de estas tres internalinas reduce la virulencia de **Listeria** en el modelo ratón de forma importante (Raffelsbauer, D. *et al.* 1998. Mol. Gen. Genet. 260).

Una línea de investigación desarrollada por el grupo de Vázquez-Boland, en nuestro laboratorio, ha dado lugar al descubrimiento de que ActA, la proteína especializada en conferir a **Listeria monocytógenes** la capacidad de desplazarse a través del citoplasma de la célula parasitada, está también relacionada con la invasión de células no fagocíticas profesionales. Es más, esta proteína solamente contribuye a la invasividad en células epiteliales y de origen nervioso, lo que sugiere que está relacionada con el tropismo celular de esta bacteria (Suárez, M. *et al.*, 1999. comunicación personal). Este hallazgo pone en evidencia cómo los microorganismos optimizan su dotación genética hasta el punto de que un único gen codifica para una proteína con funciones tan dispares y específicas como la invasión celular y el movimiento citoplasmático.



Ciclo intracelular de la Listeria.

ESCAPE DEL FAGOSOMA

Durante la infección intracelular, **Listeria** se ve englobada en un fagosoma de la célula parasitada, momento crítico para la bacteria, ya que la rápida acidificación que se induce en el compartimento intrafagosómico representa una amenaza letal para **Listeria**. Por ello sintetiza tres proteínas membranólicas que le permiten el paso al citoplasma de la célula hospedadora, donde se multiplica y continúa su ciclo infeccioso. Estas tres proteínas, una hemolisina tiol activada (listeriolisina) y dos fosfolipasas (PlcA y PlcB), han sido ampliamente caracterizadas durante el inicio de los años 90. La presencia de la hemolisina (listeriolisina) resulta indispensable para que una listeria pueda ejercitar una función patógena (**L. monocytógenes** y **L. ivanovi**).

MOTILIDAD

El estudio de la motilidad intracelular de *Listeria* ha rebasado con creces el interés puramente microbiológico. La proteína ActA, que es suficiente para conferir el movimiento intracelular a *Listeria*, está siendo utilizada como modelo para el estudio de la migración de neutrófilos a los núcleos de infección o la producción de metástasis por parte de células cancerosas (Lasa et al, 1998. *Biochem. Biophys. Acta.* **1402**).

Los estudios más recientes indican que ActA es un dímero (Mourrain et al, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**) que no interacciona directamente con los filamentos de actina de la célula hospedadora, sino que en el tramo central de la proteína, interacciona directamente con VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatador), reclutando moléculas de porfilina que son las que finalmente unen monómeros de actina y propulsan a *Listeria* como un cometa a través del citoplasma (Beckerle, 1998. *Cell.* **95**). El complejo Arp 2/3 (proteínas relacionadas con actina), parece ser necesario para la capacidad del ActA de polimerizar filamentos de actina, pero su función exacta en el proceso está todavía en estudio (Welch, M.D. et al. 1998, *Science* **281**).

SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las células eucariotas regulan sus funciones vitales por medio de una compleja red de mensajeros químicos. El área más novedosa del estudio de la patogénesis molecular bacteriana lo conforman las interferencias que producen los microorganismos en estos mecanismos de señalización celular durante la infección. *Listeria* es capaz de inducir en la célula parasitada el fenómeno de apoptosis (también denominado muerte celular programada o suicidio celular) a través de su hemolisina (listeriolisina). De esta forma la bacteria inhibe otras formas de muerte celular (lisis o necrosis) que alertarían al sistema inmune de la presencia del intruso.

En nuestro laboratorio el grupo de Vázquez-Boland ha establecido un modelo por el que *Listeria*, una vez libre en el citoplasma de la célula eucariota, estimula la movilización de los depósitos de glucógeno celular (HdC no utilizable por la bacteria) vía Inositol-trifosfato (IP3) y Protein quinasa C (PKC) a glucosa y glucosa 1 Fosfato, azúcares que la bacteria utilizaría eficientemente como fuente de carbono para su multiplicación y proliferación intracelular (Ripio et al. 1997. *J. Bacteriol.* **179**).

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA

Los patógenos han desarrollado sistemas sensibles de regulación de sus genes de virulencia, que les permiten expresar en cada momento de la infección sólo aquellos factores que les son necesarios para continuar con su ciclo, desactivando otros que no le aportan ningún beneficio en ese momento. *Listeria* posee un regulador central de la virulencia, *prfA*, cuyo producto se une a unas cajas *PrfA* situadas en la región promotora de los genes que regula, activando así su transcripción. *PrfA* posee grandes similitudes funcionales y estructurales con el regulador CRP de *Escherichia coli*, lo que refleja que a nivel molecular, las bacterias gram positivas y gram negativas están evolutivamente más relacionadas de lo que se pensaba en un principio (Vega et al. 1998. *J. Bacteriol.* **180**). También se ha sugerido que *PrfA* regula negativamente los

genes de motilidad *motAB* y *cheR* de **Listeria monocytógenes**, lo que justificaría el por qué esta bacteria es móvil a 25° C, pero inmóvil a 37° C, temperatura a la que la expresión de *prfA* es elevada (Michel et al. 1998. Microbiol. Lett. 169).

ANÁLISIS Y CONTROL

En el capítulo anterior titulado «la listeriosis como modelo» se ha destacado el elevado número de pruebas de diagnóstico microbiológico en uso a fin de lograr una detección rápida y precisa de la enfermedad.

Un diagnóstico rápido y la previsión de los alimentos implicados en el brote infeccioso son premisas para determinar y erradicar con rapidez el foco de la enfermedad por **L. monocytógenes**.

Entre el sinnúmero de pruebas de carácter fenotípico y genotípico que aparecen en la literatura científica en los últimos años, consideramos que la investigación de la actividad hemolítica junto a la fermentación de una serie corta de azúcares es un criterio esencial y suficiente para la identificación de las diferentes especies del género **Listeria** y, por su sencillez, puede aplicarse en cualquier laboratorio de diagnóstico microbiológico.

La prueba de CAMP con *Staphylococcus aureus* y *Rodococcus equi*, al ensalzar el fenómeno hemolítico, resuelve normalmente los casos dudosos, siempre que se interprete de acuerdo con nuestra propuesta (Fernández, J.F. et al. Intern. Jour. Syst. Bacteriol. 1996. 46) que es la siguiente:

	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
L. monocytógenes	+	+
L. ivanovii	-	+
L. innocua	-	-

Como prueba rápida de aislamiento en identificación de **L. monocytógenes** deben citarse también las técnicas de concentración de Listerias con bolitas mecánicas recubiertas de anticuerpo al que se fija **L. monocytógenes** presentes en un determinado alimento. Mediante atracción magnética resulta fácil concentrar, aislar e identificar la listeria.

El método resulta, sin embargo, más caro y laborioso que el CAMP Test.

RESUMEN

En el trabajo se revisan diversos aspectos de actualidad relacionados con la epidemiología y control de la Listeriosis.

Se hace especial énfasis en la patogénesis molecular, como de futura aplicación epidemiológica, y con la experiencia y aportación lograda en estos temas en el laboratorio del autor se recomiendan determinadas actitudes en cuanto a control de la enfermedad

SUMMARY

Several traits of actuality related with the epidemiology and control of Listeria infections are reviewed.

Special emphasis are made in molecular pathogenicity, and its epidemiological future and, based in the experience and contribution of the author in these listeria issues, some recomendatis are advised respect the control of the disease.

LOS FACTORES ECOLÓGICOS EN LA INFECCIÓN Y CONTAGIO

GUILLERMO SUÁREZ FERNÁNDEZ

Laurie Garret Premio Pulitzer, en su libro «The Coming Plague» hace una seria y fundamentada advertencia de los peligros que acechan a un mundo donde la tasa de mortalidad humana por enfermedades infecciosas se ha incrementado un 30 por cien en la última década.

Un tercio de las muertes por enfermedad se deben a una causa infecciosa.

La malaria origina dos millones de bajas anuales.

A lo largo de los años 90 han enfermado de tuberculosis cerca de cien millones de personas con una letalidad del 30 por cien.

El Vicepresidente Al Gore en la última campaña presidencial pronunció la siguiente frase «No existe mayor amenaza para la salud pública, hoy en día, que las enfermedades infecciosas emergentes».

El premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1958, Joshua Lederberg, últimamente dedicado al estudio profundo y detallado del fenómeno de la emergencia infecciosa escribía en 1998 «El germen que ayer mató a un niño en un lejano continente, puede afectarnos hoy a nosotros y dar lugar mañana a una pandemia mundial».

El fenómeno de la emergencia microbiana, siendo de gran actualidad, no es nuevo. A lo largo de la historia se han descrito un sinnúmero de brotes epidémicos de diferentes enfermedades tales como viruela, tifus, sarampión, disentería, escarlatina, lepra, tuberculosis, peste negra o bubónica y otras varias.

Especialmente peligrosas fueron las oleadas de peste negra, no menos de medio centenar, desde la edad media hasta el Siglo XVIII en Europa, acantonándose posteriormente en Asia central, en donde tuvo su origen.

En el Siglo XIX en la época de Pasteur y Koch predominaban enfermedades emergentes como el carbunco, rabia, tuberculosis y cólera.

* Conferencia pronunciada el 9 de junio de 1999.

La actualidad de la emergencia y reemergencia infecciosa tiene su asiento en la intensidad del fenómeno y en la paradoja que supone su incremento en los países de economía boyante, con superior desarrollo sanitario.

EL RETO BIOLÓGICO DE LA EMERGENCIA MICROBIANA

El fenómeno biológico de la emergencia infecciosa, tal y como se ve hoy, comienza a tomar forma en los años setenta. En la tabla 1, a continuación, se relaciona una selección de procesos emergentes de carácter infeccioso.

Año	Agente	Enfermedad
1973	<i>Rotavirus</i>	Causa principal de la diarrea infantil
1975	<i>Parvovirus B19</i>	Anemia crónica hemolítica
1976	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Enterocolitis sistémica
1977	Virus Ébola	Fiebre hemorrágica aguda
	<i>Legionella pneumophila</i>	Enfermedad de los legionarios
	Hantavirus	Fiebre hemorrágica con síndrome renal o pulmonar
	<i>Campylobacter spp</i>	Patógeno entérico de gran difusión
1980	HTLV-I	Leucemia humana de células T
1981	Toxina estafilocócica	Síndrome de choque tóxico
1982	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Colitis hemorrágica
	HTLV-II	Leucemia de células pilosas
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Enfermedad de Lyme
1983	HIV	SIDA
	<i>Helicobacter pylori</i>	Úlcera gástrica
1986	Priones	Enfermedad de las «vacas locas»
1988	<i>Herpesvirus humano-6</i> (HHV-6)	Eritema por virus herpes
1989	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiosis humana
	Hepatitis C	Hepatitis C
1991	Virus Guanarito	Fiebre hemorrágica venezolana
1992	<i>V.cholerae O139</i>	Cólera
	<i>Rochalimaea henselae</i>	Enfermedad angiomatosa por mordedura de gato
1993	V. Cañon muerto	Síndrome pulmonar por hantavirus
1994	Virus Sabia	Fiebre hemorrágica brasileña
1996	Priones y barrera de especie	Encefalopatía espongiiforme bovina y Creutzfeldt-Jacob

TABLA 1

Las principales determinantes de las infecciones emergentes y reemergentes son las siguientes:

- Crecimiento de la población
- Calentamiento del planeta
- Actividades humanas
 - Industrialización
 - Urbanización
 - Pantanos
 - Riego
 - Viajes

Guerra
 Difusión de enfermedades sexuales
 Contaminación con residuos
 Pobreza y desnutrición
 Incremento de refugiados y personas desplazadas
 Incremento de personas de edad avanzada

Los efectos potenciales del crecimiento de la población mundial se relacionan a continuación:

Contagio directo
 Probabilidad de calentamiento atmosférico
 Incremento de viajeros
 Guerras frecuentes
 Incremento de refugiados y personas desituadas
 Hambre y malnutrición
 Ciudades dormitorio
 Incremento de la pobreza
 Suministro de agua deficiente *
 Proyectos de riego y pantanos

El control de las infecciones emergentes y reemergentes puede esquematizarse con una perspectiva de futuro (ver tabla 2).



TABLA 2

EL CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN Y CALENTAMIENTO DEL GLOBO

La interrelación de los principales determinantes sociales en las infecciones emergentes se establece en la tabla nº 3.

* Nuevas tecnologías podrían prevenir este efecto.

INTERRELACIÓN DE LOS PRINCIPALES DETERMINANTES SOCIALES EN INFECCIONES EMERGENTES

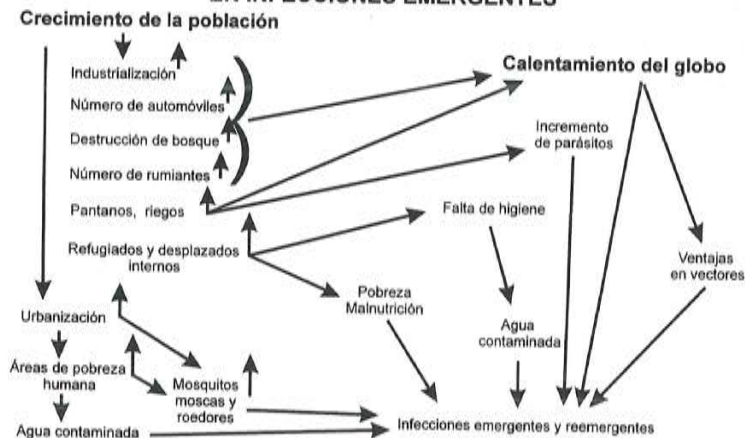


TABLA 3

Los dos factores primarios son el aumento de la población mundial y la elevación térmica progresiva como fenómeno planetario. De estos dos polos quedan entrelazados, en forma de cascada, diferentes determinantes de los tipos económico y social.

VIROIDES Y PRIONES

Las nuevas formas de acción infecciosa destacan en el fenómeno de la emergencia microbiana y se refieren a los viroides, patógenos de las plantas sin que puedan descartarse de la patología animal, con unas características que podrían resumirse así:

Ácidos Ribonucleicos Subvirales

Patología vegetal

¿Patología animal?

Pequeña molécula de RNA circular 246-399 bases y alto contenido en estructura secundaria.

Información necesaria para inducir la propia síntesis en células diana y en un hospedador adecuado.

Biotropismo.

Estos patógenos subvirales son causa de importantes enfermedades en el mundo vegetal tales como el tubérculo fusiforme de la patata, mosaico del melocotonero, moteado del crisantemo, manchado del aguacate, etc. de gran interés económico en la zona levantina española.

Pero, sin duda alguna, es la teoría del Prión enunciada por Prusiner en 1983 y que le ha proporcionado el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1997, la que debe considerarse tema estrella en el fenómeno emergente.

La temática de investigación actual sobre Priones, agentes «no convencionales» simples proteínas capaces de producir graves alteraciones en el hombre y animales, conocidas como encefalopatías espongiformes, se relaciona a continuación:

- * Empleo de ratones transgénicos y modificados genéticamente en la investigación sobre priones.
- * Estructura y función de las proteínas príon.
- * Localización ultraestructural de la proteína príon en la conexión neuromuscular e implicaciones metabólicas.
- * Papel funcional de la proteína príon en el metabolismo del cobre.
- * Uso de proteínas infecciosas de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio sobre priones.
- * El elemento genético no mendeliano de *S. cerevisiae* URE3 es una forma de proteína príon procedente de Ure 2p, un regulador del catabolismo del nitrógeno.
- * Actividad neuronal de la sintasa de óxido nítrico (nNOS), en ratones infectados experimentalmente de *scrapie* y con ablación del gen que codifica PrP (*ratones noqueados*).
- * Activación inflamatoria de la microglia y astrocitosis inducida por fragmentos de la proteína príon infecciosa.
- * La proteína príon resistente a la proteasa producida «in vitro» carece de infectividad.
- * Existe similitud, a nivel molecular, entre la proteína BSE y una estirpe aislada de un caso de «Scrapie» natural. Sin embargo, las características de transmisión al ratón diferían. Gran interés epidemiológico. ¿Se puede transmitir BSE a la oveja por vía natural?
- * Variante Heidenhain de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Diferenciación clínica.
- * Los priones infectantes PrP se multiplican en los tejidos linforreticulares antes de la invasión neural. Este hecho encierra importantes implicaciones diagnósticas.

Por último queremos dedicar un último capítulo al sorprendente fenómeno atmosférico de El Niño como inductor de epidemias emergentes en cualquier parte del mundo.

EL NIÑO

El Niño es un término climatológico firmemente acuñado de gran uso y actualidad, asociado siempre a desastres naturales, tales como tornados, huracanes y tifones, a

ciclones, borrascas, tempestades y diluvios, a tormentas tropicales y galernas marinas, cuando no a sequías desertizantes y quemas de bosques, aunque estas últimas se achacan a *La Niña* que sigue a *El Niño* como reacción, en un tercio de los casos, aproximadamente.

Y, por si esto fuera poco, la Academia Americana de Microbiología, nos envía una publicación en la que se establece la bien documentada relación entre Clima, Enfermedad Infecciosa y Salud.

El fenómeno de *El Niño* se ha considerado como un ciclo vicioso de la naturaleza que aparece con gran aparato inicial de carácter grave, que oculta consecuencias no menos graves a más largo plazo de tal manera que las borrascas se transforman más tarde en infecciones en el hombre y animales.

Enfermedades como la Malaria, Fiebre del Valle del Rif, Neumonía por Hantavirus, Leptospirosis, Cólera y Virosis del Río Ross, entre otras, han causado epidemias humanas desencadenadas sin duda, por el efecto *El Niño*.

Antes de seguir nos parece indicado aclarar que, en nuestra opinión, estos problemas de orden biológico y médico están bajo cierto control, porque a pesar de las complejas interrelaciones entre factores climáticos y sociales que caracterizan al nuevo fenómeno biológico de la emergencia microbiana, de carácter infeccioso, no es menos cierto que la información acumulada de datos atmosféricos y oceánicos transmitidos por satélite, junto al análisis informático de estos y otros diversos parámetros, nos dan pie para elaborar modelo predictivos frente a posibles riesgos de infección.

Sin embargo, frente a las turbulencias atmosféricas, vendavales e inundaciones, la lucha resulta mas difícil que prevenir o curar infecciones.

Amplias zonas de las regiones ecuatoriales seguirán siendo empobrecidas o arrasadas periódicamente por *El Niño*, si bien la pérdida en vidas humanas se podrá prevenir también, con un lapso de tiempo cada vez más amplio.

¿Qué es *El Niño*, origen de tan devastadoras consecuencias? Es, ni más ni menos, una oscilación del clima que se caracteriza por el calentamiento de las aguas superficiales del Océano Pacífico, especialmente evidente en la región ecuatorial, que se acompaña de un descenso en la presión barométrica en su parte oriental y de un debilitamiento de los vientos superficiales en esta zona.

La Niña, cuando aparece, supone contrariamente, un enfriamiento de las aguas, lo que origina escasez de lluvias al disminuir la evaporación.

Estos eventos alteran la distribución de la lluvia en los trópicos y provocan cambios meteorológicos que afectan a todo el globo de forma directa o indirecta.

La relación entre clima y salud no es algo que se descubra ahora; se conocía en las Civilizaciones más antiguas y era doctrina hipocrática griega 500 años (a.C.). Y los romanos, con Galeno, aconsejaban a los enfermos de tuberculosis tomar una calzada y alejarse cuanto más mejor en busca de un cambio de clima.

El efecto de perturbación climática a largas distancias del suceso ecológico alterante, también era bien conocido. Todos hemos oído repetir una y otra vez que el vuelo de una mariposa en Australia o en China puede originar un tifón en las Azores o algo de parecido significado, queriendo recordar el efecto de amplificación en cascada de ciertos meteoros.

Si esto es así ¿dónde está la novedad del fenómeno de *El Niño*? Quizá lo está en el conocimiento preciso de los mecanismos fenomenicos al aplicar nuevas tecnologías de investigación, que permitan, al tiempo, analizar minuciosamente gran parte de las consecuencias más allá de su acción inicial catastrófica o desapercibida, en el orden climático.

Es lógico pensar genéricamente que las enfermedades infecciosas transmisibles por insectos o diferentes artrópodos, dependen del número de estos en un determinado ambiente influenciado a su vez por la temperatura y grado de humedad.

Se ha comprobado que las temperaturas más cálidas favorecen el desarrollo de enfermedades víricas transmitidas por mosquitos, al acortar el periodo de incubación extrínseco del virus en el vector artrópodo, abreviando el pase del intestino a las glándulas salivares, por ejemplo.

En 1993 se detectó un importante brote infeccioso por Hantavirus en el oeste americano que se asoció con *El Niño*, puesto que la abundante lluvia en la región produjo una gran cosecha de piñones y consecuentemente, un incremento de los roedores, portadores del virus y esta circunstancia fue minuciosamente analizada a nivel epidemiológico para concluir que la proliferación del reservorio del virus era la causa de la epidemia.

En 1996 se estableció la asociación entre la temperatura superficial del agua y la incidencia del cólera en Bangladesh. El agente productor del cólera, *Vibrio cholerae*, vive en los estuarios sobre la superficie e interior de ciertos crustáceos fluviales y marinos de reducido tamaño.

Cuando asciende la temperatura superficial del agua florecen las microalgas y este fitoplancton sirve de nutriente a los diminutos crustáceos o copépodos del zooplancton y *V. cholerae* se multiplica extensamente al disponer del adecuado cobijo parasitario, lo que sucedió en la referida epidemia de Bangladesh.

En 1998 tuvo lugar en Venezuela un foco extenso de Malaria, enfermedad producida por protozoos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles*, siendo asociado el ciclo reproductivo del insecto a *El Niño*.

Muchos otros casos estudiados aseguran la relación de *El Niño* con diversas enfermedades transmisibles.

En toda esta doctrina climática hay aspectos muy claros y también numerosos interrogantes. Es evidente que para avanzar en el conocimiento se requiere una colaboración interdisciplinar con intervención de las siguientes materias, como mínimo: Microbiología, Epidemiología, Ecología, Oceanografía, Climatología, Ciencias atmosféricas y del espacio, Biología marina y Métodos informáticos predictivos o de modelización climática, siguiendo criterios de aplicación biológica y médica.

Quedan, no obstante, unas cuantas preguntas no resueltas de manera contundente: ¿Asistimos realmente a un calentamiento global de la atmósfera terrestre? ¿Se deben los agujeros en la capa de ozono y el efecto invernadero al desarrollo industrial y a la polución, únicamente? ¿Son los cambios de posición del eje de rotación de la Tierra con respecto al Sol la única causa de las variaciones climáticas?

El cambio de polaridad magnética, observable por ejemplo en el yacimiento de Atapuerca en los minerales ferromagnéticos de diferentes estratos y que ha permitido datar con precisión no radiométrica la antigüedad de los restos fósiles ¿qué significa?, ¿por qué sucede cada 300.000 años de promedio esta inversión de polos magnéticos?, ¿por qué ocurrió una sola vez en todo el periodo cretáceo?, ¿tiene alguna relación con los cambios del clima?

En la obtención a corto plazo de respuestas claras a estas y otras incógnitas, en relación con la evolución climática terrestre somos pesimistas.

No obstante, la realidad de la emergencia infecciosa está ahí propiciada por factores climáticos y sociales, y con gran acierto se ha dicho que no hay lugar en el mundo del cual estemos desconectados y algunas enfermedades infecciosas localizadas en cualquier punto de la Tierra representan una amenaza potencial generalizada, debido a la interdependencia global, transporte moderno, comercio y al cambio de los modelos culturales y sociales.

BIBLIOGRAFÍA

- Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage-in Nicaragua. *MMWR* 44(44):841-843.
- Clark R. 1993. *Water: The International Crisis*. Cambridge: MIT Press.
- Colwell RR. 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274:2025-31.
- Moore PS, CV Broome. 1994. Cerebrospinal meningitis epidemics. *Scientific American* 271:38-45.
- Nicholls N. 1993. El Niño-southern oscillation and vectorborne disease. *Lancet* 342:1284-1285.
- Reeves WC, JL Hardy, WK Reisen, MM Milby. 1994. The potential effect of global warming on mosquito-borne arboviruses. *J. Medical Entomology* 31:323-332.
- Shope RE. 1992. Impacts of global climate change on human health: spread of infectious diseases. In: *Global Climate Change: Implications, Challenges, and Mitigation Measures* (Majumdar SK, LS Kalkstein, B Yarnal, EW Miller, LM Rosenfeld, Eds.). Pennsylvania Academy of Science, 363-370.
- Suárez, G. 1996. Encefalopatías espongiiformes. *Alimentaria*. 275:159-162.
- Suárez, G. 1997. Nuevas formas de acción infecciosa. El Prión y las Encefalopatías Espongiiformes. *Anales Real Academia Nacional de Medicina*. 114:309-330.
- Suárez, G. 1997. Patógenos emergentes y zoonosis. *Curso sobre Zoonosis*. Edit. M. Álvarez. Universidad de León. Secretaría de Publicaciones.
- Suárez, G. 1997. El impacto social de las infecciones emergentes. *Anales de la Real Academia de Doctores*. 1:55-68.
- Suárez, G. 1998. Los animales como reservorios de enfermedades transmisibles al

- hombre. *Anales de la Real Academia de Doctores*. 2:217-230.
- Suárez, G. 1998. El reservorio animal en los ciclos de infección y contagio. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*. 5:29-41.
- Suárez, G. 1998. Medicina preventiva frente a emergencia infecciosa. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*. 115:571-579.
- Tong S, P Bi, K Parton, J Hobbs, AJ McMichael. 1998. Climate variability and transmission of epidemic polyarthritis. *Lancet* 351:1100.
- Watson RT, MC Zinyowera, RH Moss (Eds.). 1996. *Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Wenzel RP. 1994. A new hantavirus infection in North America. *N. Engl. J. Med.* 330:1004-5.
- World Health Organization. 1996. *Climate change and human health*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 1996. *World Health Report 1996: Fighting Disease, Fostering Development*. Geneva: World Health Organization.

CITOTOXICIDAD DE LA COCAÍNA: ESPÈCIES REACTIVAS DE OXIGENO Y APOPTOSIS

ASUNCIÓN ZARAGOZA, CARMEN DíEZ-FERNÁNDEZ,
DAVID ANDRÉS, ALBERTO ALVAREZ y MARÍA CASCALES*

1. INTRODUCCION

1.1. Farmacología y toxicidad de la cocaína

La cocaína (2-β-carbometoxi-3β-benzoiloxi-tropano) (Figura 1) es un alcaloide obtenido a partir de las hojas del árbol de la coca o *Erythroxylon coca* (*E. coca bolivianum*) que fue introducido en terapéutica por sus propiedades como anestésico local. Sin embargo, este alcaloide es más conocido por su consumo ilícito debido a sus efectos estimulantes y euforizantes.

La cocaína actúa como anestésico local por bloqueo de la iniciación y conducción del impulso nervioso, inhibiendo el rápido incremento de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio durante la despolarización. A dosis elevadas, también puede bloquear los canales de K⁺ [76]. Además de su acción local, la cocaína puede actuar a nivel sistémico sobre el sistema nervioso central, la función neuromuscular y ganglios autónomos, ya que inhibe la recaptación presináptica del neurotransmisor noradrenalina, así como la de la serotonina y la dopamina, produciendo un efecto complejo sobre el sistema dopaminérgico [28].

Los efectos de la cocaína tras una dosis de 25 a 150 mg (una línea de coca contiene 20-30 mg) son: euforia, rara vez disforia, incremento de la energía, de la agudeza

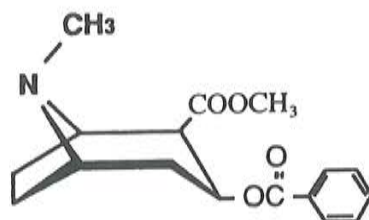


FIGURA 1. Estructura de la cocaína

* Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.

mental y estado de alerta, incremento sensorial, anorexia, pérdida del sueño, disminución de la sensación de fatiga, incremento de la autoconfianza y egocentrismo. En general se admite una dependencia psíquica [34] pero no física para la cocaína, si bien se presentan síntomas debidos a una descarga simpática generalizada.

Muchos de los efectos tóxicos directos de la cocaína resultan de la intensa estimulación simpática central y/o periférica. Los efectos neuromusculares y autónomos incluyen taquicardia, hipertensión, hipertemia, midriasis, parada respiratoria y colapso cardiovascular. La estimulación del sistema nervioso central puede dar lugar a problemas neuropsiquiátricos como hiperactividad, irritabilidad, insomnio, agitación, psicosis (a menudo paranoide), delirio y coma. Otro tipo de toxicidad por cocaína de considerable interés es la observada en mujeres embarazadas que abusan de esta droga. Además de afectar el embarazo, su uso puede dañar al feto y producir anomalías tanto en el comportamiento como en el desarrollo del neonato.

1.2. Metabolismo y hepatotoxicidad de la cocaína

La administración de la cocaína por cualquier vía sistémica provoca, además de las numerosas complicaciones descritas y las alteraciones específicas relacionadas con algunas vías de administración (necrosis del tabique nasal, edema pulmonar, etc), efectos hepatotóxicos, puestos de manifiesto tanto en animales de experimentación como en el hombre [10, 64, 84]. Observaciones previas [23, 24, 72] permitieron clasificar la droga como una hepatotóxina potente tras su administración intraperitoneal, tanto aguda como crónica. La administración de cocaína a ratones da lugar a un daño hepático severo en forma de infiltración grasa, necrosis mediozonal y periportal, y marcada elevación en los niveles de transaminasas, manifestaciones similares a las que se observan con la administración de tetracloruro de carbono. La susceptibilidad de los animales y la localización de la lesión varía según raza, especie y el uso previo de agentes moduladores del citocromo P-450, de modo que la inducción del citocromo P-450 incrementa la toxicidad y hace que la lesión hepática se aproxime hacia la zona periportal [13, 64, 69]. Según esto, la hepatotoxicidad de la cocaína no se debe a la droga como tal, sino a los productos de su metabolismo oxidativo.

El metabolismo de la cocaína transcurre principalmente por hidrólisis. El 90 % de la cocaína se transforma rápidamente, mediante la acción de pseudocolinesterasas plasmáticas y esterasas hepáticas, en benzoilecgonina, ecgonina metil éster y ecgonina [75]. Todos estos metabolitos se eliminan por orina y ninguno de ellos presenta hepatotoxicidad cuando se administran a ratones en dosis elevadas [23, 78]. Aunque las rutas hidrolíticas inactivan farmacológicamente la cocaína, la vía secundaria de su metabolismo, la oxidativa, parece ser la responsable de su hepatotoxicidad. Este proceso gira en torno al nitrógeno del anillo del tropano y los enzimas responsables de llevarlo a cabo son el sistema citocromo P-450 y la FAD-monooxigenasa, ambas monooxigenasas microsómicas de función mixta. Diversos estudios *in vivo* han demostrado que la hepatotoxicidad de la cocaína se potencia con inductores del citocromo P-450 como el fenobarbital [13] o el etanol [9], así como que el tratamiento previo con inhibidores del citocromo P-450 como la cimetidina [63] protegen frente al efecto hepatotóxico de la droga.

La superfamilia del citocromo P-450 consiste en un gran grupo de proteínas distintas con grupo hemo, implicadas en el metabolismo de numerosos xenobióticos y

compuestos endógenos [39, 58]. Las diferentes isoformas presentan el mismo centro catalítico (el hierro del grupo hemo), pero distinta apoproteína, para catalizar la oxidación de los diferentes compuestos, dando lugar a metabolitos estables o metabolitos reactivos (Figura 2); éstos últimos pueden atacar al mismo P-450 e inactivarlo, limitando la formación del intermediario y con ello su toxicidad [62]. Se ha sugerido que las familias génicas 1,2 y 3 del citocromo P-450 son las principales responsables del metabolismo hepático de los xenobióticos [37, 89], aunque existen trabajos contradictorios acerca de las formas individuales del citocromo que llevan a cabo el metabolismo N-oxidativo de la cocaína. En el hígado de rata, el CYP 2B1, inducible por fenobarbital, cataliza la N-desmetilación de la cocaína [6], mientras que en el ratón y en el hombre son las isoformas del CYP de la subfamilia 3A las principales responsables de este primer paso en la cascada de bioactivación de la cocaína [49, 61].

Así pues, una pequeña fracción de la cocaína administrada (10 %) es desmetilada por las citocromo P-450 monooxigenasas o por las FAD-monooxigenasas (Figura 3). La cocaína desmetilada, la norcocaína, se oxida rápidamente a N-hidroxinorcocaína [46], que puede dar lugar por último norcocaína nitróxido, pudiendo ser estos metabolitos los responsables de la hepatotoxicidad de la droga [36, 45]. Así mismo, el radical norcocaína nitróxido puede ser reducido nuevamente a la forma N-hidroxilada que lo originó, mediante la acción de una flavoproteína en presencia de NADPH [67]. De esta forma, el metabolismo de la cocaína desencadena un ciclo redox fútil que consume NADPH en los dos sentidos, y que además genera H_2O_2 en la oxidación de la N-hidroxinorcocaína, y $O_2^{\cdot -}$ en la reducción de la norcocaína nitróxido [46]. Estos procesos tienen dos consecuencias: por un lado, la reacción de las especies reactivas de oxígeno y otros radicales formados a partir de la cocaína con cualquiera de las macromoléculas celulares, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, proteínas, nucleótidos o ácidos orgánicos, causando grandes daños en la célula, a través de la peroxidación lipídica de las membranas, lesiones al DNA u oxidación de proteínas. Por otro lado, la producción del ciclo fútil entre los dos metabolitos oxidados de la cocaína, la N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido, disminuye los niveles de NADPH, y con ello la actividad de la glutatión reductasa dependiente de este coenzima. Este enzima se encarga de mantener los niveles de GSH que la célula necesita

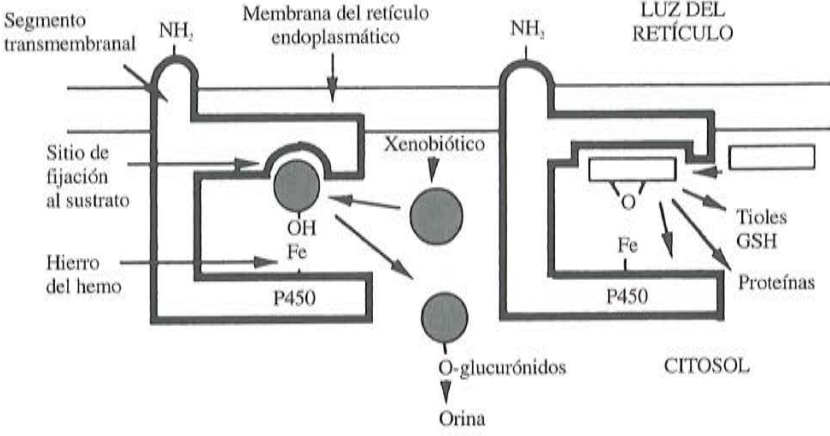
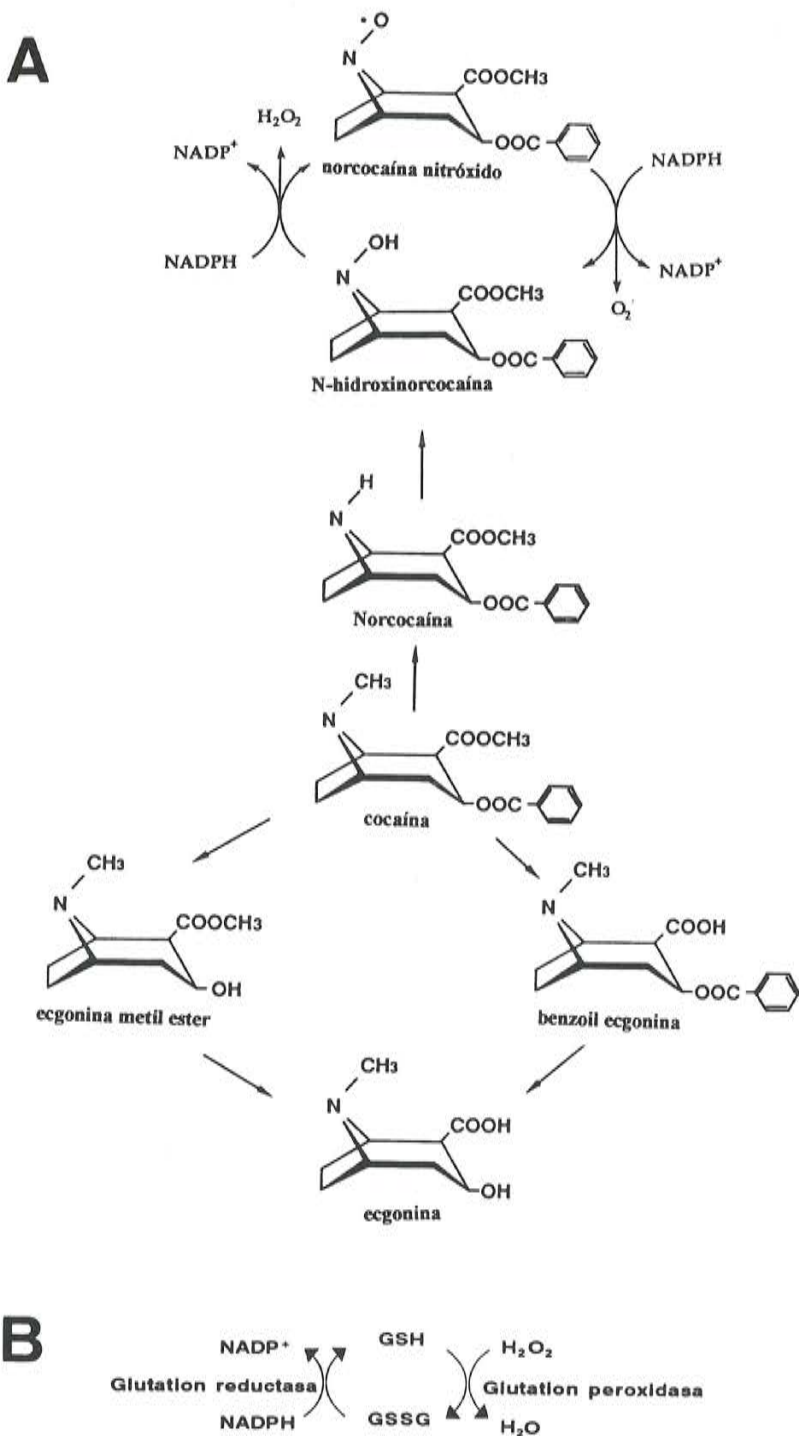


FIGURA 2. Estructura y actividad del citocromo P-450 [62]



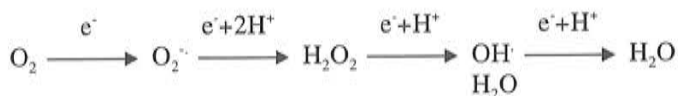
para reducir, a través de la glutatión peroxidasa, los peróxidos producidos (tanto H_2O_2 como peróxidos orgánicos) y anular sus acciones. Si el glutatión no puede ser regenerado, la defensa que ofrece su ciclo frente a agentes oxidantes queda comprometida.

Como las esterasas comparten con los enzimas oxidativos el proceso de biotransformación de la cocaína, la inhibición de las esterasas da lugar a concentraciones más elevadas de metabolitos oxidados [4]. Así, se ha visto que la acción hepatotóxica de la cocaína en el hombre depende de la idiosincrasia del individuo, siendo mayor cuando el nivel de colinesterasas es bajo [73, 84]. De igual forma, los diferentes grados de hepatotoxicidad que presenta la cocaína según la especie animal depende del porcentaje en que esta droga sea metabolizada por vía oxidativa [16]. En hepatocitos aislados de rata, la cocaína se manifiesta como hepatotóxica, lo cual no ocurre *in vivo*, debido a que el contenido en esterasas de los microsomas hepáticos es mucho menor que la actividad esterásica en plasma [68].

1.3. Radicales libres de oxígeno

El oxígeno es un elemento esencial para la vida en su papel de aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, principal fuente de energía en los organismos aerobios. Sin embargo, la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que en esta utilización del oxígeno por las células se generan radicales libres, moléculas o átomos con un electrón desapareado en su orbital más externo.

La vía univalente de reducción del oxígeno da lugar a tres formas «incompletamente reducidas» del oxígeno entre éste y el agua: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , que no es un radical pero puede generarlos y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}):



Tanto el anión superóxido como el H_2O_2 tienen una reactividad baja, pero es de extrema importancia eliminarlos rápidamente de la célula, ya que su combinación, en presencia de metales de transición, como Fe y Cu, produce un derivado mucho más tóxico, el radical OH^{\cdot} , que sí posee una elevada reactividad, y frente al cual no existe protección enzimática [22].



La generación de radicales libres de oxígeno forma parte del metabolismo normal de las células (Figura 4). Su presencia puede ser beneficiosa para las células y, de hecho, se están produciendo continuamente en el organismo, siendo necesarios muchos de ellos para llevar a cabo ciertas reacciones biológicas. Sin embargo, puede originarse una superproducción de estas especies, como consecuencia, por ejemplo, del metabolismo de un xenobiótico, o bien una disminución de los sistemas antioxidantes de defensa, dando lugar a una situación que se conoce con el nombre de estrés oxidativo [41].

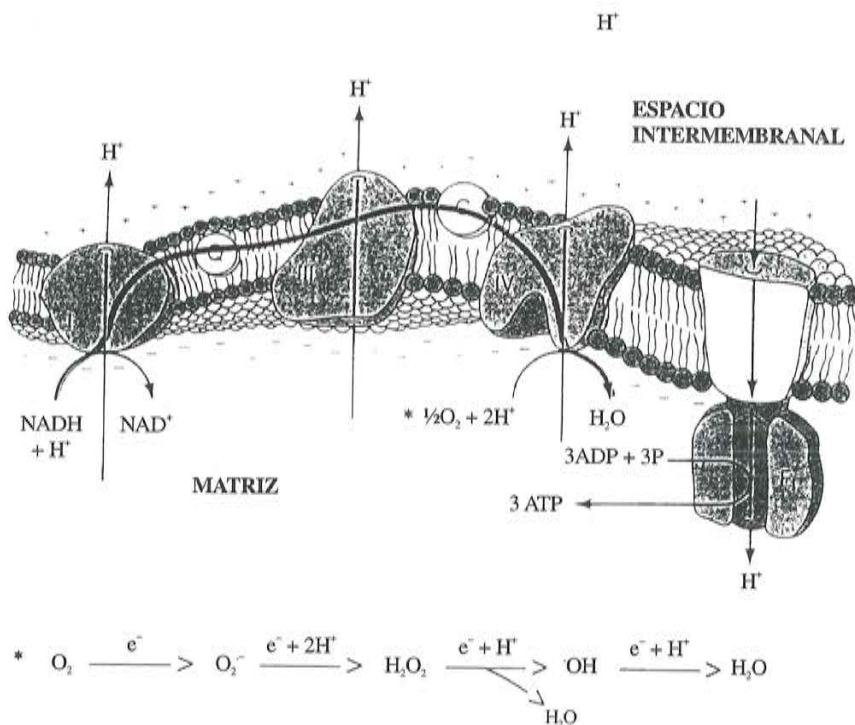
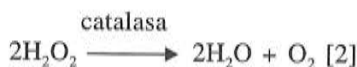
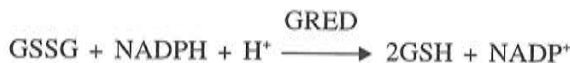


FIGURA 4. Producción de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte electrónico de la mitocondria

Los enzimas encargados de eliminar el O_2^- y H_2O_2 son la superóxido dismutasa, que acelera la dismutación espontánea de este radical, produciendo H_2O_2 y O_2 (reacción 1); la catalasa, que transforma el H_2O_2 produciendo oxígeno y agua (reacción 2); y la glutatión peroxidasa, que reduce tanto el H_2O_2 como otros peróxidos, a la vez que oxida la forma reducida del glutatión (GSH) a su forma oxidada (GSSG) (reacción 3):



A su vez, el GSH consumido por la glutatión peroxidasa puede regenerarse a través de la glutatión reductasa (GRED). Este enzima citosólico reduce el GSSG utilizando el NADPH, equivalente reductor que puede ser generado por varios sistemas de óxido-reducción dependientes del NADPH [17].



Entre los componentes celulares hay además moléculas que presentan una particular tendencia a reaccionar con cualquiera de las especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas, que captan los radicales y frenan sus reacciones en cadena, se denominan antioxidantes. Podemos clasificar estos antioxidantes no enzimáticos en dos grupos: hidrosolubles, cuyos principales representantes son el ácido ascórbico, el ácido úrico y el glutatión, y liposolubles, entre los que se incluyen la vitamina E y los carotenoides.

Ninguno de los sistemas antioxidantes descritos desempeña una función central en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno. Al contrario, una protección eficiente habrá de ser proporcionada por la coordinación adecuada entre todos los enzimas y demás antioxidantes de la célula (Figura 5). Cuando los radicales libres de oxígeno sobrepasan la capacidad protectora de las defensas antioxidantes, puede producirse, mediante diversos mecanismos, la lesión celular [91].

1.4. Muerte celular: Apoptosis y Necrosis

La muerte celular es la consecuencia final del daño producido por un estímulo patológico, pero también es un fenómeno natural en la regulación y mantenimiento de la homeostasis en las células y tejidos del organismo. Así, es posible diferenciar dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis [42, 51]: la apoptosis tiene lugar principalmente en condiciones fisiológicas o como resultado de un estímulo patológico suave, mientras que la necrosis ocurre siempre en condiciones patológicas [50, 52].

Apoptosis y necrosis pueden caracterizarse atendiendo a los cambios morfológicos que se producen dentro de las células, pero también es posible diferenciar ambos procesos cuando se observan *in vivo*, tanto por su distribución como por las reacciones

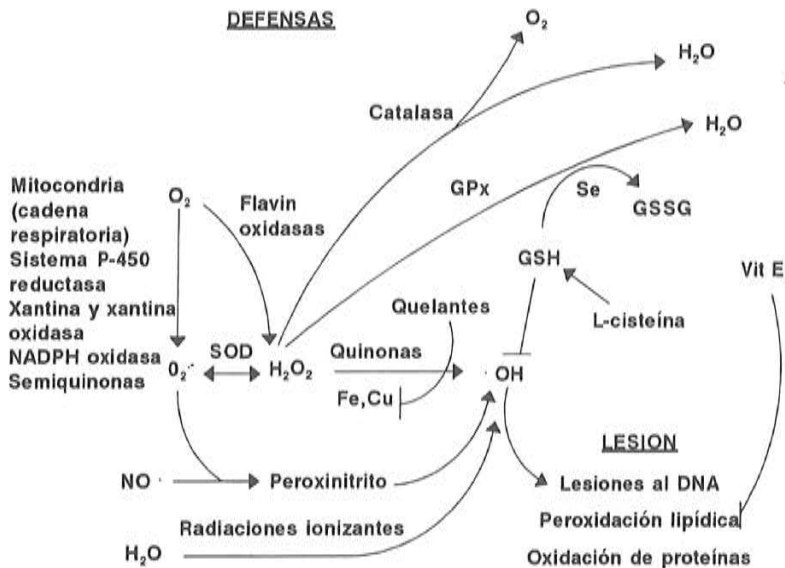


FIGURA 5. Principales rutas de formación de especies reactivas de oxígeno y defensas antioxidantes. Las reacciones no están ajustadas estequiométricamente, y solamente se recogen las más importantes [43].

tisulares que los acompañan. Así, mientras que la necrosis sucede en grupos de células contiguas y suele inducir una respuesta inflamatoria aguda, la apoptosis tiene lugar generalmente en células dispersas del tejido y no suele ir acompañada de infiltración de leucocitos. Estas y otras características de la muerte celular por apoptosis y necrosis, se resumen en la tabla 1, comparando ambos procesos [40].

La muerte celular por apoptosis es esencial para el desarrollo de los seres vivos [14, 21]. Ocurre en todos los estados de la organogénesis durante el desarrollo embrionario; se alterna con la mitosis durante el recambio normal de los tejidos, representando el balance entre la proliferación y la eliminación celular. Hoy se reconoce que la pérdida del control de la apoptosis juega un papel importante en enfermedades tales como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, y quizás también incluso en el proceso de envejecimiento [11, 77].

1.4.1. *Acontecimientos bioquímicos y moleculares en las células que mueren por apoptosis*

Los genes y proteínas en la destrucción activa de las células representan un foco de intensa investigación en años recientes. Estos estudios, sin embargo, han revelado

<i>Características</i>	<i>Apoptosis</i>	<i>Necrosis</i>
Estímulo	Fisiológico o patológico	Patológico
Origen	Pérdida de un factor de crecimiento, influencia hormonal, estímulo tóxico suave	Anoxia, daño químico, daño físico
Propiedades de adhesión	Inmediatamente perdidas	Inicialmente intactas
Primera manifestación	Reducción celular, ecogimiento	Hinchamiento celular
Cambios nucleares	Condensación, cariorrexis	Cariolisis
Cromatina nuclear	Marginación, segmentación	Plegamiento nuclear
Cambios nucleolares	Intacto, degradado al final	Granulado
Integridad de membrana	Persiste durante un tiempo	Fallo temprano
Morfología superficie	Alisamiento, blebbing	Lisis
Cambios en superficie	Expresión de vitronectina y trombospondina	Ninguno
Cambios citoesqueleto	Protrusión en superficie, budding citoplasmático, formación cuerpos apoptóticos	Fragmentación, liberación de contenidos celulares
Mitocondria	Inicialmente no afectada	Hinchamiento, entrada de Ca ²⁺
RE/Aparato de Golgi	Inicialmente no afectados	Dilatados
Vacuolas	Estructuralmente intactas	Hinchadas (leaky)
Síntesis de proteínas	Puede bloquearse por actinomicina D y cicloheximida	No afectada por antibióticos
Cambios citoplasmáticos	Ca ²⁺ ↑, endonucleasa ↑, transglutaminasa ↑ p-53 ↑, bcl-2 ↓, c-myc ↑	Ruptura de lisosomas, liberación del contenido
Cambios nucleares	Ruptura internucleosomal, escalera de DNA	Degradación difusa, smear DNA
Células afectadas	Células individuales, células dispersas	Grupos de células contiguas, áreas tisulares
Eliminación	Englobamiento por macrófagos y células endoteliales	Inflamación en tejidos adyacentes
Formación de cicatrices	Ausente	Presente

TABLA 1. *Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis [40].*

poca o ninguna evidencia para poder afirmar la existencia de genes o proteínas específicos de muerte celular. La cascada de señales intracelulares que conducen a la apoptosis parece estar estrechamente conectada con las vías que conducen a la replicación, diferenciación y reparación, pudiendo frecuentemente usar las mismas moléculas.

El programa para llevar a cabo la muerte por apoptosis está presente en la práctica totalidad de las células de los mamíferos, y puede ser activado por numerosas señales extra e intracelulares. Aunque los diferentes pasos y mecanismos bioquímicos que intervienen en la apoptosis no están completamente esclarecidos, parece claro que la apoptosis transcurre generalmente en cuatro etapas: la decisión de morir, la ejecución de la muerte, la fagocitosis de los fragmentos resultantes y, por último la degradación [74].

1.4.1.1. PREPARACIÓN PARA LA MUERTE CELULAR: DECISIÓN DE MORIR

La mayoría de los inductores o mediadores de la apoptosis pueden incluirse en una de las cinco categorías siguientes, dependiendo del lugar inicial de perturbación dentro de la célula [87]: a) agentes que actúan en la superficie celular, b) agentes que alteran el citosol y orgánulos, c) perturbadores del citoesqueleto, d) alteración del núcleo, y e) agentes que alteran la señalización intracelular. Todos ellos se resumen en la tabla 2.

<i>Sitio de acción</i>	<i>Posible mecanismo</i>	<i>Ejemplo</i>
Superficie celular	Activación receptores de membrana Alteración permeabilidad de la membrana	Glutamato, NMDA, Kainato Ionóforos: A23187, ionomicina Inhibidores del transporte de iones: amiloride, ouabafina Detergentes: triton X-100
Citosol y orgánulos	Oxidantes intracelulares Quelantes Alteración de síntesis proteica Alteración de gradientes iónicos	Menadiona TPEN, deferoxamina Inhibidores transcripción: actinomicina D Inhibidores traducción: cicloheximida R.Endoplásmico: tapsigargina Vacuolas: bafilomicina, concanamicina A Mitochondria: MPTP
Citoesqueleto	Alteración estructura Alteración filamentos actina	Taxol, colchicina, vincristina Citochalcinas
Núcleo	Ruptura integridad del DNA	Alteración estructura: adriamicina Inhibición síntesis: metotrexato, pirimidinas fluoradas
Señales intracelulares	Alteración expresión génica Alteración fosforilación proteica Alteración transducción señal Segundo mensajero erróneo en TNF, Fas, radiaciones	Hormonas nucleares: vit D, glucocorticoides Aumento: ácido okadaico, PMA Inhibición: estaurosporina Aumento: análogos AMPc Inhibición: flutamida, tamoxifeno Ceramide

TABLA 2. Agentes que inducen la apoptosis. Abreviaturas utilizadas: MPTP, *N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; NMDA, *N*-metil-*D*-aspartato; PMA, 12-miristato-13-acetato de forbol; TNF, factor de necrosis tumoral; TPEN, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenodiamina [87].

1.4.1.2. EJECUCIÓN DE LA MUERTE CELULAR, FAGOCITOSIS Y DEGRADACIÓN

La apoptosis muestra un patrón de muerte celular característico [79, 90]. Los primeros cambios afectan a las uniones con células vecinas, ya que se produce la pérdida de las regiones de contacto y otras estructuras especializadas de la membrana. A continuación, el citoplasma se encoge, el núcleo se agrupa en forma de masas condensadas, que después se fragmentarán, y la célula pierde su forma inicial. Al investigar la causa de las alteraciones del tamaño celular durante la apoptosis, se observa un incremento en la densidad, lo que sugiere la pérdida selectiva de agua y electrolitos conservándose las estructuras más densas. La rápida salida de agua de la célula ocurre por la dilatación del retículo endoplásmico y su posterior fusión con la membrana citoplasmática. Se ha atribuido esta pérdida selectiva de fluidos a la inhibición de un sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ [88]. También durante este período se ha detectado actividad transglutaminasa en las células afectadas [25, 26]. Estas enzimas forman puentes cruzados entre proteínas, haciéndolas insolubles incluso frente a los agentes desnaturizantes más fuertes. La presencia de un armazón rígido de proteínas entrecruzadas bajo la membrana de las células apoptóticas podría ser la causa de la alteración de la forma y también de la disminución del volumen celular.

La condensación de la cromatina nuclear es la alteración más significativa que tiene lugar durante la apoptosis [1], debida a la desorganización de su estructura al producirse la ruptura de la doble cadena del DNA a nivel de las regiones que unen los nucleosomas, conduciendo a la fragmentación del DNA en oligonucleosomas de ± 200 kDa o algún múltiplo de este número (Figura 6). Como responsable de la fragmentación, se ha identificado una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio, activa a pH neutro, que es inhibida por zinc [35].

Tras la fragmentación de la cromatina nuclear, la célula se divide en los denominados cuerpos apoptóticos, cada uno rodeado de membrana conteniendo sus orgánulos

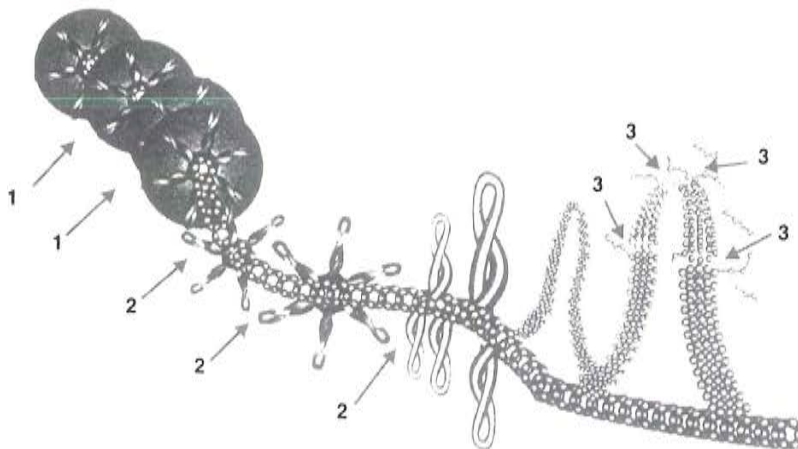


FIGURA 6. Sitios de fragmentación de la cromatina. El modelo de la estructura de la cromatina está tomado de Filipski et al. [27]. Las flechas muestran los tres niveles a los que actúan las endonucleasas sobre el DNA, que representan tres niveles de organización de la cromatina nuclear [83].

y fragmentos de DNA, que son englobados por células parenquimales vecinas o células fagocitarias especializadas. Las propias células apoptóticas inducen su fagocitosis mediante cambios en su membrana citoplasmática, observándose recientemente que los macrófagos humanos se unen a neutrófilos apoptóticos a través de su receptor vitronectina, un miembro de la familia de las integrinas que se había considerado únicamente como una molécula de adhesión celular [70].

Una vez incluidos en el interior del fagosoma, los cuerpos apoptóticos se degradan rápidamente, hasta que desaparecen membranas, orgánulos y demás estructuras celulares. Al contrario que en la necrosis, no hay liberación del contenido celular al medio extracelular.

1.4.2. *Acontecimientos bioquímicos y moleculares en las células que mueren por necrosis*

Los primeros cambios morfológicos que ocurren durante la necrosis resultan de la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana. El citoplasma y los orgánulos celulares van aumentando progresivamente de volumen, la célula adquiere una apariencia homogénea, opaca, y se incrementa la eosinofilia del citoplasma. Todos estos cambios terminan con la destrucción de los orgánulos, la liberación del contenido celular al medio extracelular y, finalmente, la desintegración de las membranas celulares. Es muy fácil reconocer todas estas modificaciones, pero resulta más difícil definir tanto las causas como las vías y mecanismos bioquímicos a través de los cuales se produce. Entre estos mecanismos merecen destacarse cinco clases de acontecimientos: a) ubiquitinación de las proteínas celulares, b) depleción del ATP, c) formación de especies reactivas de oxígeno, d) alteración de la homeostasis del calcio, y e) pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana.

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, abundante en todas las células eucariotas y con una estructura muy conservada entre las diferentes especies. En presencia de ATP, forma enlaces covalentes con residuos de lisina de otras proteínas y su síntesis se induce, junto con la de las proteínas del choque térmico (hsp), durante la lesión celular. Su principal función parece ser el marcaje de las proteínas que han resultado dañadas para su degradación. Las proteínas modificadas pueden acumularse en el citoplasma en forma de inclusiones, mostrando con ello la incapacidad de las células dañadas de hacer frente a la incrementada concentración de proteínas marcadas para la degradación [44].

En las células que mueren por necrosis se detecta una depleción del ATP, observándose que el aumento de volumen del citoplasma y la pérdida de la homeostasis celular solamente aparecen cuando los niveles de ATP disminuyen por debajo de ciertos valores críticos. Esto se ha demostrado durante el daño celular que sigue a situaciones de hipoxia [31], puesto que el suministro de oxígeno es necesario para que las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial sinteticen ATP. Sin embargo, la disminución de los niveles de ATP no parece ser causa suficiente para producir la necrosis, aunque limita el desarrollo de las funciones celulares que dependen de él.

Las especies reactivas de oxígeno, generadas por adición de electrones al oxígeno molecular, si llegan a sobrepasar la capacidad protectora de los sistemas antioxidan-

tes de la célula, pueden provocar la muerte celular mediante diversos mecanismos, por reacción con las macromoléculas celulares. Al reaccionar con los lípidos, se desencadena la peroxidación lipídica de las membranas celulares, alterando su permeabilidad, siendo las de la mitocondria las más vulnerables, quizá porque a la elevada producción de estas especies reactivas (por la presencia de grandes cantidades de oxígeno y metaloproteínas) se suma su elevado contenido en dobles enlaces C-C. La reacción de los derivados de oxígeno con las proteínas, principalmente a nivel de sus grupos tiólicos, tiene especial relevancia en el equilibrio iónico celular, ya que la Ca-ATPasa y la Na/K-ATPasa de las membranas contienen numerosos grupos SH. La acción de las especies de oxígeno sobre el DNA incluye, además de la ruptura de las cadenas de la molécula, otro efecto secundario: la inducción del enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa, con la consiguiente pérdida del ADP celular, que conduce a la reducción de los nucleótidos de adenina (incluyendo el ATP) a niveles críticos. Además de provocar estas reacciones, la producción de especies reactivas de oxígeno altera el equilibrio redox de la célula. Por ejemplo, se genera NADP⁺ en la mitocondria sujeta a estrés oxidativo a expensas de la disminución de los niveles de NADPH, lo que conduce a la salida de calcio al citoplasma. Así, en resumen, las especies reactivas de oxígeno provocan el aumento de la permeabilidad de la membrana, la inhibición de las bombas iónicas, la depleción del ATP y el aumento del calcio citosólico [56].

El aumento incontrolado del calcio citosólico se considera tanto una causa como un resultado de la muerte celular [59]. El aumento del calcio intracelular induce una serie de mecanismos que van a desencadenar un ciclo continuo de reacciones que conducirán a la lesión celular: así, las proteasas dependientes de calcio, una vez activadas, serían las responsables de la destrucción de las Ca-ATPasas de las membranas celulares, impidiendo que la célula recupere sus niveles normales de calcio citosólico. Así mismo, las alteraciones en la morfología de la célula necrótica podrían deberse a la interacción de estas proteasas con elementos del citoesqueleto [60]. Las fosfolipasas sensibles al calcio también se activarían originando la alteración de los fosfolípidos de las membranas que así aumentarían su permeabilidad a muchos solutos.

La pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana es una de las principales características que permite identificar la necrosis. Se produce como resultado de todos los procesos anteriormente descritos, y es la desencadenante de las alteraciones morfológicas que determinan la destrucción de la célula.

1.5. Objetivos

Los cultivos primarios de hepatocitos se utilizan cada vez con mayor frecuencia para estudiar los mecanismos de acción de compuestos hepatotóxicos. Sin embargo, debido al proceso de desdiferenciación sufrido por las células hepáticas en este tipo de cultivos, es frecuente observar un descenso de los niveles de enzimas citosólicos y de otros enzimas específicos del hígado, entre los que se encuentran las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450, a través del cual se lleva a cabo fundamentalmente el metabolismo oxidativo de la cocaína. Por esta razón, los hepatocitos se aíslan de ratas pretratadas con inductores enzimáticos, con objeto de elevar la expresión de los sistemas microsómicos dependientes del citocromo P-450 y mantener su actividad a lo largo de todas las horas de cultivo.

Mediante el uso de este modelo experimental nos propusimos los objetivos siguientes:

- A. Examinar la toxicidad de la cocaína sobre cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital frente a variables de tiempo y concentración.
- B. Evaluar cuantitativamente en función de la concentración y mediante técnicas de imagen la generación de radicales libres de oxígeno.
- C. Establecer la relación entre niveles de radicales libres y muerte celular.
- D. Detectar la capacidad apoptogénica de la cocaína sobre los hepatocitos en cultivo mediante técnicas de imagen, gel de agarosa y citometría de flujo.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Productos

Los medios de cultivo fueron suministrados por BioWhittaker. Los ácidos, bases y sales minerales utilizados fueron de las casas comerciales Merck y Panreac, en su grado analítico. La colagenasa fue de Boehringer, la heparina sódica de Leo y la agarosa de Hispanagar. El diacetato de fluorescina y Hoechst 33258 fueron de Molecular Probes, mientras que el yoduro de propidio fue de Sigma. El clorhidrato de cocaína fue suministrado por el Servicio de Restricción de Estupefacientes del Ministerio de Sanidad y Consumo.

2.2. Animales

Se utilizaron ratas macho de 2 meses (200-250 g) de la raza Wistar. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura, con libre acceso a pienso de la casa comercial Sanders S.A. y agua.

Con el fin de inducir el sistema monooxigenasa microsómico, encargado del metabolismo oxidativo de la cocaína, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis diaria de 80 mg/Kg de fenobarbital sódico durante los cinco días anteriores al experimento.

2.3. Obtención de hepatocitos y cultivos celulares

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo por perfusión del hígado *in situ* con medio Hepes (Hepes 20 mM, KCl 5 mM, SO_4Mg 1 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5 mM, ClNa 150 mM y Glucosa 10 mM) con colagenasa, de acuerdo con el método clásico de Krebs *et al* [47] y descrito por Díez-Fernández *et al* [20] que permite obtener hepatocitos con un elevado porcentaje de viabilidad.

La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante tinción de exclusión con una solución de Azul de Tripán (preparada al 0,2% en suero salino). Las células

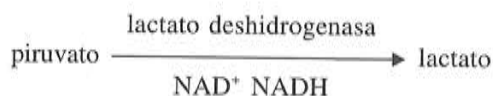
mueras o con la membrana plasmática dañada aparecen teñidas al observarlas al microscopio óptico, mientras que las que permanecen vivas y mantienen su membrana íntegra no incorporan el colorante al interior de la célula y aparecen sin teñir. El conteo de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima cuando dió valores superiores al 90%.

Las células obtenidas se cultivaron en placas de 60-mm a una densidad de 7.1×10^4 células/cm² en 3 ml de medio DMEM suplementado con penicilina, estreptomycin y gentamicina a una concentración de 50 µg/ml (DMEM completo) y 10% FCS (suero fetal de ternero). Tras un período de tres horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂/ 95% aire, el medio fue reemplazado por DMEM completo en el que se substituyó el FCS por albúmina de suero bovina (BSA) al 0.1%.

2.4. Tratamiento con cocaína y determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Después de una incubación de 24 horas se procedió a la adición a los cultivos de medio fresco con las diferentes concentraciones de cocaína (0, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.000 mM) durante un período de 24 horas.

La actividad de la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27.), como parámetro de daño irreversible de la membrana y muerte celular [86], se determinó espectrofotométricamente en el medio de cultivo y en el interior celular midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD⁺ en la reacción de reducción del piruvato a lactato [81], según el siguiente proceso:



empleándose en los cálculos un coeficiente de extinción para el NADH = $6,2 \times 10^6$ M⁻¹ Cm⁻¹ (extinción de 1 mmol de NADH en 1,00 ml de solución).

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: tampón Tris-HCl 67,5 mM a pH 7,4; NADH 0,3 mM; y piruvato 4 mM a pH 7.

2.5. Análisis por citometría de flujo y microscopía confocal de la producción de radicales libres de oxígeno

La producción intracelular de radicales libres de oxígeno se determinó usando el compuesto 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA), siguiendo el método descrito previamente [3]. El compuesto tiene la particularidad de atravesar la membrana celular, dado su carácter no polar. Las células viables son capaces de desacetilar el compuesto dando lugar a la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), compuesto no fluorescente, estable algunas horas y que al ser polar queda atrapado en el interior de la célula. Este intermediario reacciona cuantitativamente con las especies reactivas de oxígeno intracelulares produciendo el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina, que puede medirse como un índice de la capacidad oxidativa intracelular.

2×10^6 hepatocitos tratados con las diferentes concentraciones de cocaína se tripsinizaron con tripsina-EDTA e incubaron a 37°C durante 30 minutos con 3 ml de PBS conteniendo DCFH-DA 5 μ M y yoduro de propidio 10 μ g/ml, preservando las muestras de la luz. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS, cuantificándose la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo, analizándose 10.000 células por muestra.

Para la determinación de la producción de radicales libres de oxígeno por microscopía confocal, los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂/ 95% aire con DCFH-DA (5 μ M en PBS) y yoduro de propidio (10 μ g/ml) durante 30 minutos, procediéndose seguidamente al lavado de las placas dos veces con PBS. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su observación en el microscopio confocal.

2.6. Ensayos morfológicos

Las características morfológicas típicas de la apoptosis, tales como el cambio de forma de la membrana, la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, así como la formación de los cuerpos apoptóticos, pueden reconocerse por tinción de las células con fluorocromos y posterior observación al microscopio de fluorescencia. El compuesto utilizado fue el Hoechst 33258, un fluorocromo derivado del benzimidazol que emite fluorescencia azul cuando se excita por la luz ultravioleta a 360 nm. Presenta una alta afinidad por el DNA, preferentemente por las regiones ricas en el par adenina-timina.

Tras el tratamiento de las células con las diversas dosis de cocaína, éstas se fijaron durante 5 minutos en frío con una mezcla de metanol/acético 3:1. Después, se adicionó a las placas el Hoechst (5 μ g/ml), manteniéndose durante 10 minutos, tras los cuales se lavaron las placas con agua destilada. Finalmente, las células se mantuvieron en una solución de ácido cítrico 20 mM, orto-fosfato disódico 50 mM y glicerol al 50% (pH 5,5) hasta su examen al microscopio.

2.7. Análisis de la fragmentación del DNA

La fragmentación del DNA se detectó por electroforesis en geles de agarosa [55]. Este procedimiento está basado en la observación de que el DNA aislado de células apoptóticas se encuentra dividido a nivel de los segmentos que unen los nucleosomas por la activación de una endonucleasa endógena. Los fragmentos de DNA resultantes, de 200 pares de bases o múltiplo de este número, se desplazan a través del gel y aparecen en forma de bandas escalonadas.

Las células, junto con el medio de cultivo, se recogieron en PBS y, tras centrifugar a 50 g durante 2 minutos, se trataron con 0,5 ml de buffer de lisis de pH 7,8 que contenía N-laurilsarcosin al 0,5% en Tris-HCl 0,1 M y EDTA 10 mM. Tras mantener durante 30 minutos en baño de hielo y centrifugar durante 30 minutos a 13.000 rpm, se recogió el sobrenadante, que se incubó, primero, con RNAsa A a una concentración final de 10 μ g/ml a 37°C durante 30 minutos, y en segundo lugar con proteinasa K a una concentración final de 250 μ g/ml a 50 °C durante 45 minutos. Después, se realizó la extracción del DNA con fenol-cloroformo, y se precipitó el DNA extraído con 2

volúmenes de etanol absoluto y CINA 0,5 M durante 2 días a -20°C. Tras lavar el precipitado obtenido con etanol al 75%, el DNA se resuspendió en 20 µl de una solución formada por Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 30 V durante 8 horas a través de un gel de agarosa al 1,8% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, visualizándose y fotografiándose el DNA usando luz UV.

2.8. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en poblaciones de hepatocitos

Mediante la utilización del citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un laser de argón de 15 mW, se llevó a cabo el estudio a nivel celular del contenido y distribución del DNA. Este parámetro se considera de gran utilidad para determinar la cito y genotoxicidad de los xenobióticos [18]. Las células se analizaron utilizando un test suministrado por Bio-Rad basado en el método de Vindelev *et al* [82]. 2×10^6 hepatocitos se tripsinizaron con tripsina-EDTA, se lavaron con una solución tampón de sacarosa 130 mM, citrato trisódico 40 mM y DMSO, y se congelaron a -80°C hasta el momento del análisis por citometría de flujo, en el cual se añadió yoduro de propidio, siguiendo las indicaciones del test, manteniéndose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se analizaron 10.000 células por muestra. La señal procedente del yoduro de propidio se recogió por un DM 610 nm y se seleccionó mediante un BP 630/30. Los datos se adquirieron utilizando un módulo discriminador de dobletes (DDM) para recoger las señales fluorescentes provenientes de células únicas.

2.9. Métodos estadísticos

Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media (SEM) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por duplicado o cuadruplicado de un número variable de experimentos que se especifican en cada caso. Las comparaciones se efectuaron mediante el análisis de la t de Student. El nivel de significación estadística se definió como $p < 0,01$.

3. RESULTADOS

3.1. Efectos citotóxicos de la cocaína en cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas inducidas con fenobarbital

Durante el desarrollo de modelos experimentales para la evaluación de los efectos tóxicos de xenobióticos, la utilización de métodos rápidos, reproducibles y baratos ha sido un requerimiento esencial. La liberación de enzimas citoplasmáticos por parte de las células dañadas al medio de cultivo ha demostrado ser un método muy útil para la evaluación de la toxicidad en cultivos primarios obtenidos de una gran variedad de órganos, incluyendo corazón, hígado y riñón. Específicamente, este método evalúa la capacidad de la membrana plasmática de retener los enzimas celulares. La lactato deshidrogenasa (LDH) es un enzima exclusivamente citosólico y su liberación al medio de cultivo tras la exposición a xenobióticos se relaciona con la ruptura de la permeabilidad de la barrera celular, la membrana plasmática [86].

Los cultivos de hepatocitos, aislados de ratas tratadas con fenobarbital durante cinco días, fueron expuestos a concentraciones crecientes de cocaína (1-2.000 μM) durante 24 horas midiéndose la liberación de LDH al medio de cultivo como un índice de muerte celular (Figura 7).

Los resultados obtenidos indican que el efecto citotóxico es dependiente de la concentración. Así, la actividad de la LDH en el medio fue aumentando progresivamente, siendo significativo este aumento a partir de dosis de cocaína de 250 μM . A concentraciones intermedias de cocaína (50-100 μM) el porcentaje de liberación de LDH al medio de cultivo ya sufre incrementos con respecto al control, siendo los valores de un 17% para el control, y de un 31% y 32% para concentraciones de cocaína de 50 y 100 μM respectivamente.

Paralelamente, tras la adición de la cocaína a los cultivos, se midieron las variaciones experimentadas en la actividad de la LDH en el medio a lo largo de la duración del cultivo. Las muestras se tomaron al cabo de 2, 10 y 24 horas de incubación, y los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 3. Como puede observarse, a medida que transcurre el tiempo de incubación se va produciendo un incremento de la liberación del enzima al medio, como consecuencia de la pérdida de la viabilidad celular, de modo que el efecto citotóxico resultó ser también tiempo dependiente.

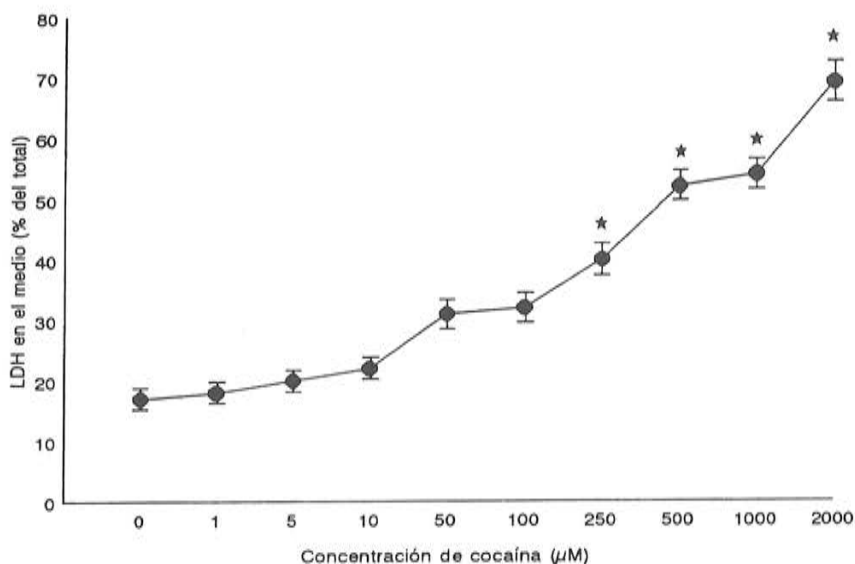


FIGURA 7. Efectos citotóxicos de la cocaína en hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital. Los hepatocitos en cultivo primario se incubaron con concentraciones crecientes de cocaína durante 24 horas. Después del tratamiento, la citotoxicidad se evaluó midiendo el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Los resultados son media de tres placas procedentes de dos animales distintos. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control (* $p < 0,01$).

Concentración de cocaína (μM)	Tiempo		
	2 horas	10 horas	24 horas
0	6,9 \pm 0,7	5,9 \pm 0,6	17,1 \pm 0,9
1	7,1 \pm 0,7	6,0 \pm 0,8	18,0 \pm 1,3
5	7,5 \pm 1,0	6,3 \pm 0,8	20,2 \pm 1,9
10	7,5 \pm 0,9	6,9 \pm 0,3	22,3 \pm 1,2
50	7,0 \pm 0,6	8,2 \pm 0,5	31,0 \pm 2,9
100	6,8 \pm 0,6	9,1 \pm 0,9	31,9 \pm 3,4
250	7,8 \pm 1,3	10,1 \pm 1,3	40,6 \pm 4,9*
500	8,4 \pm 1,1	10,4 \pm 1,2	52,3 \pm 4,9*
1.000	9,0 \pm 1,4	12,6 \pm 1,4*	54,0 \pm 5,3*
2.000	10,2 \pm 1,3	22,4 \pm 1,7*	68,8 \pm 6,2*

TABLA 3. Liberación de LDH al medio de cultivo. La actividad de la lactato deshidrogenasa se determinó en el medio de cultivo, tomando muestras a las 2, 10 y 24 horas de incubación. Los valores obtenidos se expresan como porcentaje de actividad del enzima liberado al medio. Los resultados son media de tres placas procedentes de dos experimentos representativos. La *t* de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control (* $p < 0,01$).

3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno determinada por citometría de flujo

Para investigar la causa de los efectos citotóxicos de la cocaína, puestos de manifiesto al medir la liberación de enzimas citosólicos al medio, se procedió a medir por citometría de flujo la producción de radicales libres de oxígeno por las células como un posible mecanismo desencadenante de la hepatotoxicidad de la droga [7, 45]. Las especies reactivas de oxígeno, anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, pueden ser generadas por diversas vías durante el metabolismo de numerosos xenobióticos. Tanto el $\text{O}_2^{\cdot -}$ como el H_2O_2 presentan una reactividad muy limitada, de modo que su importancia reside en la posibilidad de producir el OH^{\cdot} , altamente reactivo, con la participación de metales de transición.

La producción de estas especies reactivas de oxígeno se valoró en los hepatocitos tratados con cocaína durante 24 horas, utilizando el fluorocromo 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), altamente sensible en la detección del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos. Este compuesto, una vez incorporado a las células, es desacetilado y posteriormente oxidado por los peróxidos celulares para generar el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo se muestran en la Figura 8, donde se pueden observar los histogramas de un experimento representativo en los que se representan en abcisas la intensidad relativa de fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína frente al número de células en ordenadas. La Tabla 4 recoge el correspondiente análisis cuantitativo. Por una parte, se observa la elevada producción de peróxidos a concentraciones bajas de cocaína (entre 5 y 100 μM , alcanzando valores máximos a dosis de 10 μM). Por otra, la producción relativa de peróxidos se encuentra disminuida en las células tratadas con las dosis más altas de cocaína, a partir de 250 μM , concentraciones que ya resultan bastante tóxicas según los ensayos de liberación de LDH al medio, expuestos anteriormente.

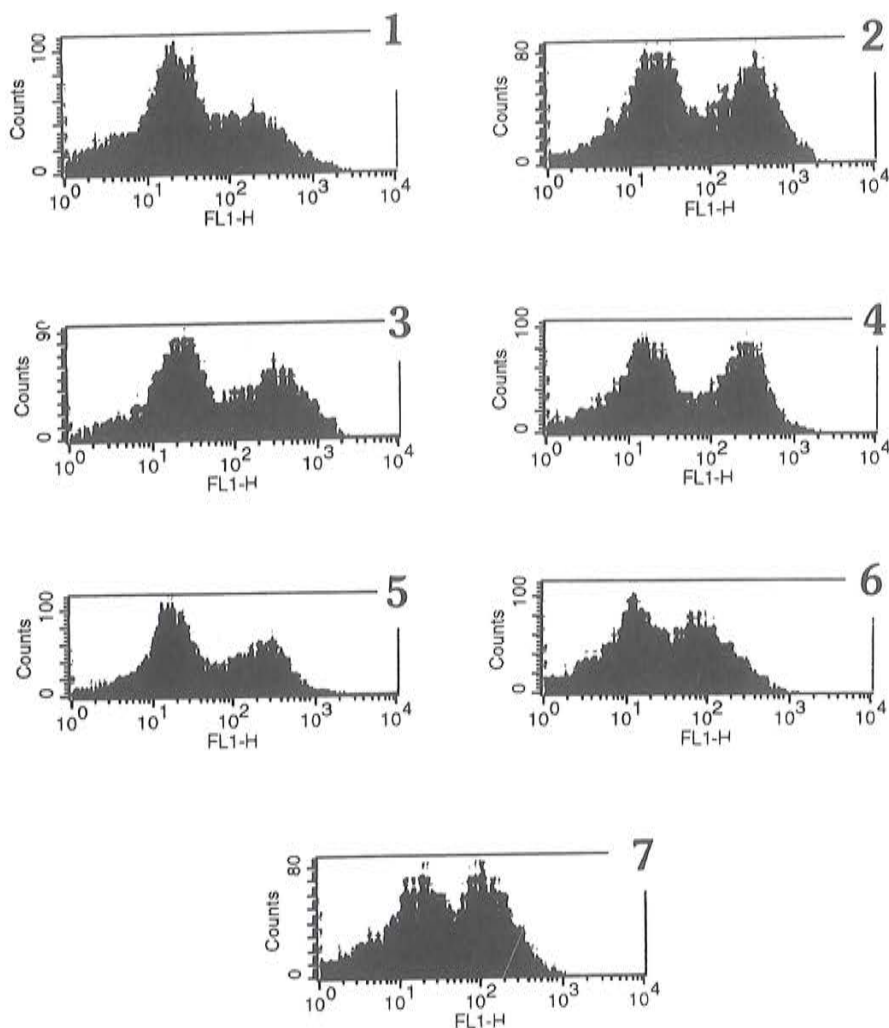


FIGURA 8. Análisis citométrico de la producción de peróxidos. Los hepatocitos tratados con cocaína durante 24 horas se incubaron con IP y DCFH-DA durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 10, (3) 50, (4) 100, (5) 250, (6) 500 y (7) 1.000 mM de cocaína.

3.3. Producción de especies reactivas de oxígeno analizada por microscopía confocal

Para comprobar los resultados registrados citométricamente, se procedió a analizar la producción de peróxidos utilizando la microscopía confocal. Las aplicaciones de la microscopía confocal son las mismas que las de la microscopía de fluorescencia, la de campo claro o la de contraste de fases, con las ventajas del aumento de resolución y la capacidad de incrementar los contrastes sin disminuir dicha resolución. Se siguió el procedimiento que se detalla en el capítulo de Material y Métodos, escaneando las células una sola vez con el laser, ya que la DCF es tan sensible a la oxidación que la

<i>Concentración de cocaína (μM)</i>	<i>Intensidad media de fluorescencia (unidades arbitrarias)</i>
0	268 \pm 28
1	272 \pm 26
5	309 \pm 33*
10	371 \pm 35*
50	330 \pm 28*
100	285 \pm 32
250	207 \pm 18*
500	142 \pm 16*
1.000	162 \pm 14*
2.000	135 \pm 14*

TABLA 4. *Análisis citométrico de la producción de próxidos. Intensidad relativa de fluorescencia de la DCFH como medida de la producción de peróxidos por las células tratadas con las diferentes dosis de cocaína. Los resultados son media de tres placas tomadas de dos experimentos representativos (* $p < 0.01$).*

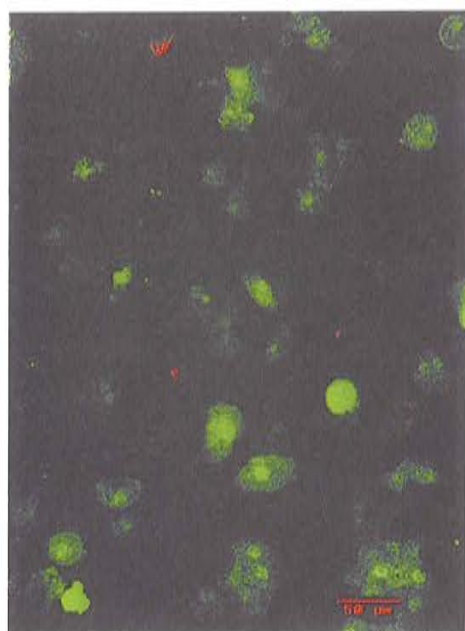
exposición a la luz laser puede inducir foto-oxidación, resultando en una fluorescencia incrementada [54]. Las fotografías (figura 9) muestran las imágenes obtenidas al incubar las células durante 30 minutos con DCFH-DA y yoduro de propidio. Las fotografías A, B, C, D, E y F corresponden a las concentraciones de cocaína de 0, 50, 100, 250, 500 y 2.000 μM , respectivamente.

En principio podemos apreciar, por la señal correspondiente al yoduro de propidio, que los cultivos tratados con las concentraciones más altas de cocaína ensayadas, principalmente 500 y 2.000 μM , aparecen mucho más teñidos (fluorescencia roja), indicando por tanto una mayor proporción de células muertas que los controles y las células tratadas con las dosis bajas de la droga. Por otra parte, la señal correspondiente a la diclorofluoresceína (fluorescencia verde) nos indica la presencia de peróxidos en las células, más abundante a medida que vamos incrementando la concentración de cocaína pero que parece disminuir al aumentar la señal del IP (concentraciones tóxicas de la droga). En estas últimas, la mayoría de los hepatocitos muestran una intensidad de fluorescencia baja, indicando que la producción de peróxidos está disminuida; sin embargo, algunas células aisladas aparecen fuertemente teñidas con el fluorocromo.

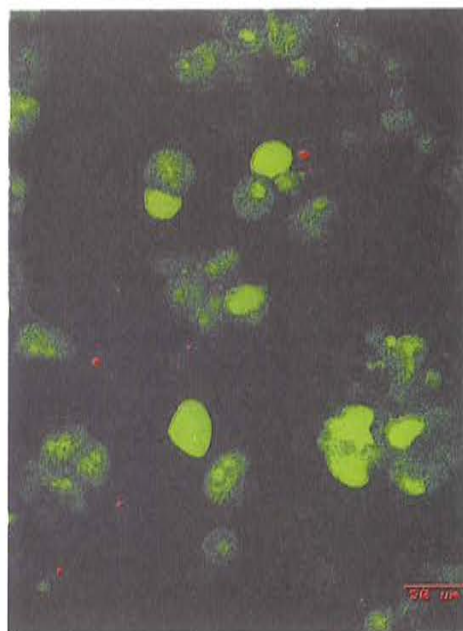
3.4. Identificación morfológica de la muerte celular

El análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte celular por microscopía confocal, reveló la existencia de células apoptóticas en los diferentes cultivos ensayados. Esta observación, nos llevó a intentar corroborar la presencia de apoptosis con otros experimentos.

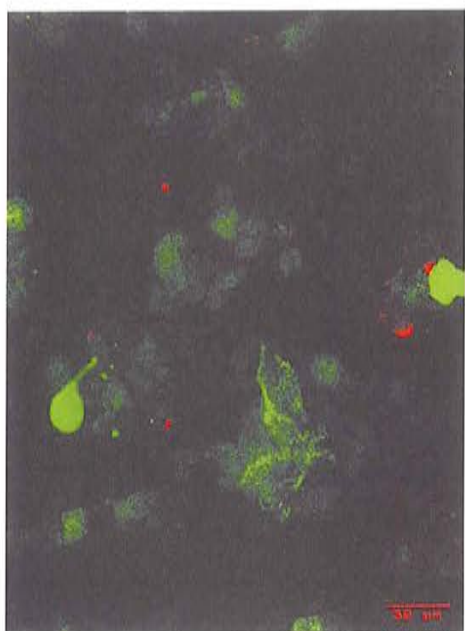
La identificación de la muerte celular por apoptosis por microscopía óptica se basa principalmente en la observación de los cuerpos apoptóticos resultantes de la fragmentación de las células. En cultivos celulares, las células apoptóticas son fáciles de reconocer hasta fases tardías de su degradación, si se utiliza algún compuesto fluorescente capaz de formar complejos con el DNA celular. En estas células puede observarse la



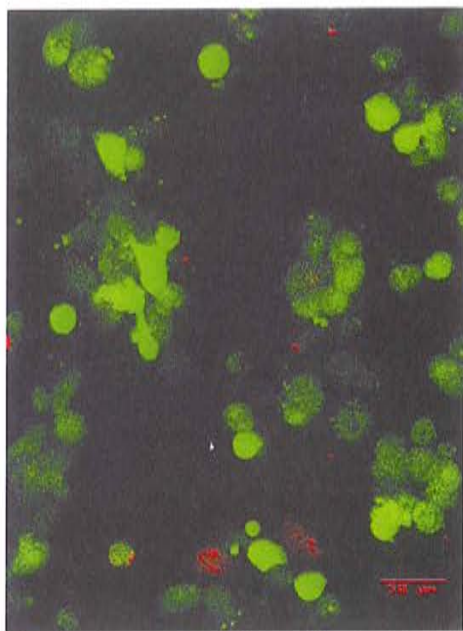
A



B

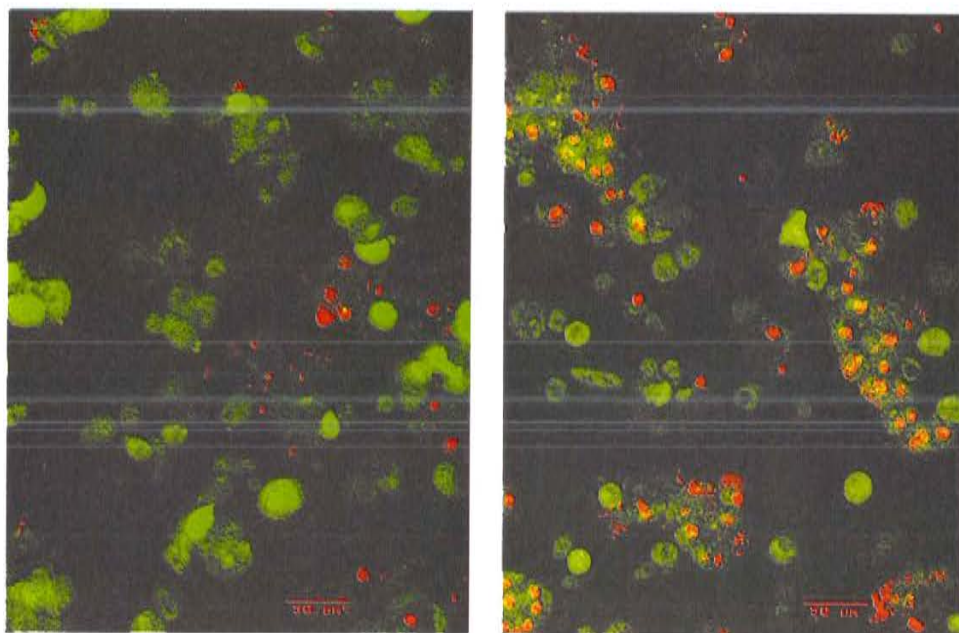


C



D

FIGURA 9. Producción de especies reactivas de oxígeno analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 50, (C) 100, (D) 250, (E) 500 y (F) 2.000 μM de cocaína.



E

F

FIGURA 9 (cont.). Producción de especies reactivas de oxígeno analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 50, (C) 100, (D) 250, (E) 500 y (F) 2.000 μM de cocaína.

cromatina nuclear condensada, dividida en fragmentos rodeados de membrana y que aparecen agrupados, resultando muy fácil distinguirlas del resto de las células.

Las fotografías muestran la morfología de los cultivos de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital, no tratados con cocaína (Fotografías 1 y 2) y tratados con cocaína en dosis de 10 μM (Fotografías 3 y 4), 50 μM (Fotografías 5 y 6) y 1.000 μM (Fotografías 7 y 8), tras proceder a la tinción de las células con el compuesto Hoechst 33258. En cada caso se muestra la imagen obtenida al hacer incidir sobre las células luz ultravioleta, así como la correspondiente al contraste de fases. En los hepatocitos control vemos las células agrupadas con los núcleos teñidos intactos, detectándose pocas células apoptóticas. Los cultivos tratados con la droga están más deteriorados, más cuanto mayor es la concentración de cocaína, y en ellos aparecen las células apoptóticas con su morfología característica, aisladas de los grupos de células vivas.

3.5. Análisis de la fragmentación del DNA

Tras la observación microscópica de la morfología celular, se procedió a valorar los cambios estructurales que sufre la cromatina nuclear con el objeto de verificar la muerte celular por apoptosis. La presencia y distribución del DNA fragmentado se visualizó y fotografió según se indica en el apartado 2.7. de Material y Métodos, aislando el DNA para después analizarlo por electroforesis en gel de agarosa. Se

procesó el DNA de los hepatocitos en cultivo, aislados de ratas pretratadas con fenobarbital, no tratados y tratados con concentraciones crecientes de cocaína. La fotografía obtenida se muestra en la Figura 10, observándose que las bandas resultantes del desplazamiento del DNA fragmentado a través del gel presentan una intensidad máxima a concentraciones de cocaína d 100 μM .

3.6. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo

El estudio de las variaciones en el DNA celular en poblaciones hepatocelulares se considera un análisis de gran precisión en determinaciones sobre la citotoxicidad y la genotoxicidad de xenobióticos. El citómetro de flujo puede cuantificar la proporción de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular, así como los cambios producidos por agentes químicos sobre la ploidía de las células, cuando se marca el DNA celular con diversos compuestos fluorescentes, tales como el yoduro de propidio. Así podemos distinguir, según la intensidad de fluorescencia emitida, células con contenido normal de DNA (correspondiente a la fase G_0/G_1), células con el doble del contenido normal de DNA (fase G_2/M), y valores intermedios asignados a la fase S del ciclo celular. Los núcleos apoptóticos pueden reconocerse por la aparición de un pico en la región hipodiploide, que puede observarse a la izquierda de la fase G_0/G_1 en el histograma.

Una vez comprobada la existencia de muerte celular por apoptosis, observando las características morfológicas del cultivo y analizando la fragmentación del DNA nuclear, se procedió a evaluar, en las muestras obtenidas a partir de cultivos de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital, la proporción de hipodiploidía consecuencia del tratamiento con concentraciones crecientes de cocaína, de 1 a 2.000 μM , durante 24 horas. Con este fin, se procesaron dichas muestras analizando las distintas poblaciones en base a su contenido en DNA. En la Figura 11 se representa



FIGURA 10. Análisis de la fragmentación del DNA por electroforesis en gel de agarosa en hepatocitos de rata tratados con cocaína. El DNA se aisló de células tratadas con cocaína (1) 5 μM , (2) 100 μM , (3) 500 μM , (4) 1.000 μM y (5) 2.000 μM . Las muestras se sometieron a electroforesis en gels de agarosa al 0,8% visualizándose con EtBr. El gel es representativo de dos experimentos realizados en cultivos procedentes de dos animales diferentes.

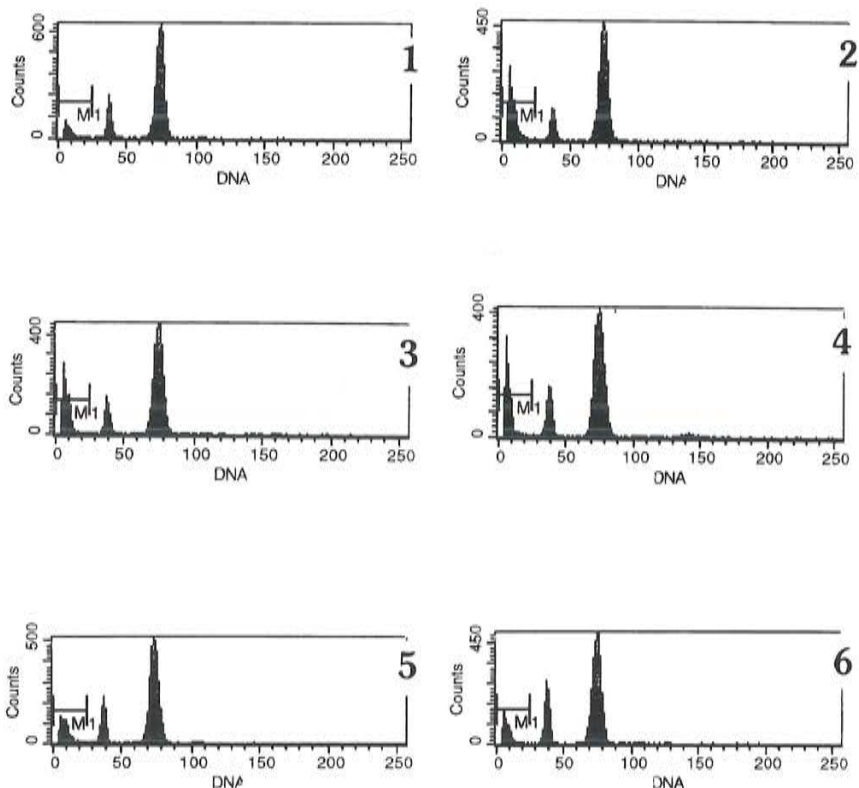


FIGURA 11. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo. Las células tratadas con cocaína se tripsinizaron y trataron según las indicaciones del kit kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Se muestran los histogramas de un experimento representativo correspondientes a las células tratadas con (1) 0, (2) 50, (3) 100, (4) 250, (5) 1.000 y (6) 2.000 μM de cocaína.

en los distintos histogramas el contenido de DNA en abcisas, evaluado por la fluorescencia emitida a 623 nm por el complejo formado por el DNA y el yoduro de propidio, frente al número de células en ordenadas. El análisis cuantitativo de los picos hipodiploides de cada histograma se muestra en la Tabla 5. Los resultados coinciden con los obtenidos al analizar la fragmentación del DNA, ya que, como puede observarse, el porcentaje de hipodiploidía va incrementándose con la dosis de cocaína, hasta llegar a un máximo a concentraciones de 50-100 μM , en que se alcanza un 20% de células apoptóticas, valor a partir del cual disminuye dicha proporción. La disminución de la hipodiploidía comienza a dosis de 250 μM , concentración en la que, según nuestras observaciones anteriores, se acentuaba el efecto necrótico de la cocaína y comenzaba a decrecer la producción de peróxidos.

4. DISCUSION

La cocaína es un alcaloide que puede utilizarse en terapéutica debido a su potente efecto anestésico local y vasoconstrictor. Sin embargo, su consumo en la actualidad

Concentración de cocaína (mM)	Porcentaje de hipodiploidía
0	7,99 ± 0,9
1	12,95 ± 1,3
5	16,62 ± 2,1
10	19,73 ± 3,1*
50	20,98 ± 2,9*
100	20,32 ± 2,6*
250	18,73 ± 2,5*
500	17,70 ± 2,6
1.000	16,44 ± 2,8
2.000	13,83 ± 3,1

TABLA 5. Porcentaje de hipodiploidía analizado por citometría de flujo. Cuantificación de los histogramas mostrados en la Figura 3. Los resultados son media de tres placas tomadas de dos experimentos representativos (* $p < 0.01$).

como droga de abuso, junto con el conocimiento de sus efectos tóxicos y complicaciones a distintos niveles, ampliamente descritos en páginas anteriores, ha llevado a los investigadores a profundizar en los mecanismos por los que la cocaína provoca tan graves efectos [2, 5, 71]. En estudios anteriores de nuestro grupo referentes a la hepatotoxicidad de la cocaína [32, 33] se demostró que su toxicidad *in vivo* se eleva en animales pretratados con fenobarbital, lo cual indica que la capacidad necrogénica de esta droga se debe a su biotransformación oxidativa a través del sistema monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450. En otros trabajos [13] se describió por primera vez que esta droga administrada *in vivo* era capaz de originar cambios específicos en la distribución del DNA e inducía la apoptosis en ratones pretratados o no con fenobarbital.

En el presente trabajo, se han investigado los efectos hepatotóxicos de la cocaína utilizando un modelo *in vitro*: cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital. La capacidad del fenobarbital de potenciar la hepatotoxicidad de la cocaína es un hecho comprobado [13, 32, 33]. Cuando el sistema microsómico oxidativo elevó su actividad mediante un tratamiento previo con fenobarbital, la severidad de la lesión hepática se elevó notablemente y su ubicación intraacinar experimentó un espectacular cambio desde la región perivenosa (en hígado no tratado con fenobarbital) a la región periportal. Esto demuestra que los sistemas oxidantes responsables de la biotransformación de la cocaína se encuentran irregularmente distribuidos en el acino hepático y son inducibles por fenobarbital.

Numerosos experimentos han mostrado que los enzimas oxidativos microsomales desempeñan un papel importante en la hepatotoxicidad inducida por cocaína [6, 46, 61, 78], y debido a la ausencia de efectos tóxicos de la droga en cultivos de hepatocitos de ratas no pretratadas con fenobarbital [36], todos los experimentos se realizaron con hepatocitos aislados tras la inducción previa del sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450.

Con el fin de evaluar el efecto tóxico de la cocaína sobre los hepatocitos en cultivo, se procedió a medir la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio [86], método por el cual podemos detectar la pérdida de la integridad de la membrana

plasmática y que, como se indicó en la introducción, es la principal característica que permite evaluar *in vitro* la muerte celular por necrosis.

En estas condiciones experimentales, hemos podido comprobar que la cocaína ocasiona un daño letal cuando se adiciona a hepatocitos en cultivo obtenidos de ratas pretratadas con fenobarbital y que el grado de toxicidad depende tanto de la concentración de la droga como de la duración del tratamiento. Esto nos ha permitido establecer las condiciones idóneas, respecto a la concentración y al tiempo de incubación, a ser utilizadas durante el presente trabajo. Por una parte, hemos observado que a tiempos muy cortos (2 horas) las variaciones en la liberación de LDH al medio no eran prácticamente detectables, y que a las 10 horas de cultivo comenzaban a detectarse cambios significativos en presencia de concentraciones elevadas del tóxico. Por tanto, decidimos mantener las células en incubación durante 24 horas, período en el que se detectaron aumentos progresivos y significativos en la actividad de LDH liberada al medio frente a incrementos progresivos en la concentración de droga. En estas condiciones de incubación, se obtuvo una curva en la que un 70 % de las células resultaron destruidas al ser expuestas a la máxima concentración de cocaína ensayada (2 mM). De acuerdo con estos resultados, está claro que en nuestros cultivos de hepatocitos la funcionalidad del sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 permanece intacta y es operativa.

Una vez establecida la capacidad citotóxica de la cocaína sobre cultivos primarios de hepatocitos, el siguiente paso fue abordar el estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad de la droga y entre ellos, la participación de las especies reactivas de oxígeno en dicha hepatotoxicidad. El demostrar esta participación reforzaría la observación de que la cocaína, al metabolizarse por vía oxidativa, genera metabolitos que, al sufrir un ciclo redox, consumidor de NADPH en ambos sentidos, da como resultado la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno [46]. Hasta la fecha, no existe una evidencia directa de la generación de estas especies reactivas de oxígeno por efecto de la oxidación de la cocaína en las células hepáticas. Existen observaciones indirectas que relacionan la hepatotoxicidad de la cocaína con el daño oxidativo en los hepatocitos, involucrando posiblemente un daño mitocondrial [7, 10, 36, 53]. Por ejemplo, se ha observado la protección que proporciona el quelante de hierro, la desferrioxamina, pero no el antioxidante α -tocoferol, frente al daño celular inducido por cocaína, lo cual es indicativo de la existencia de mecanismos oxidativos dependientes de hierro e independientes de la peroxidación lipídica [36]. Además, existen evidencias sobre el descenso de glutatión reducido y el incremento de los niveles de malondialdehído en hígado de ratón tratado con cocaína [13, 32], y la formación de glutatión oxidado en hepatocitos de rata cultivados en presencia de esta droga [7], que sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de la cocaína.

Como la respuesta de cada célula al tóxico es heterogénea, es difícil en experimentos *in vivo* y por métodos convencionales encontrar la verdadera causa/efecto. Por ello se requiere investigar la progresión de la lesión inducida por agentes tóxicos sobre células aisladas, para observar en espacio y tiempo la secuencia de eventos que preceden y conducen a la muerte celular.

Por todo ello, y mediante el análisis por citometría de flujo, hemos determinado los niveles relativos de especies reactivas de oxígeno en los hepatocitos utilizando el compuesto 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA), que posee la capaci-

dad de atravesar las membranas celulares, y una vez en el interior de la célula se hidroliza a 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH). Por oxidación, la 2',7'-diclorodihidrofluorescina se convierte en 2',7'-diclorofluorescina (DCF), cuya fluorescencia es específica en la detección de peróxidos [19, 29]. Así, hemos podido observar que en las células tratadas durante 24 horas con dosis bajas de cocaína el contenido en peróxidos se incrementaba marcadamente, mientras que, en los cultivos de hepatocitos tratados con dosis más elevadas de la droga, se encontraba disminuida la capacidad de las células de oxidar la diclorofluorescina. Por este método se han podido detectar las variaciones en el contenido de peróxidos de los hepatocitos dependientes de la concentración de cocaína adicionada al medio.

Resultados similares se obtuvieron examinando la morfología de las células por microscopía confocal, técnica que permite visualizar *in situ* en células individuales la muerte celular (apoptosis o necrosis) mediante la fluorescencia del yoduro de propidio y la producción de especies reactivas de oxígeno mediante la fluorescencia de la DCF.

De acuerdo con los datos obtenidos, la generación de especies reactivas de oxígeno está involucrada en la secuencia de acontecimientos que conduce a la muerte celular, sugiriéndose que en esta secuencia el incremento en la generación de estas especies reactivas ha de preceder a la manifestación de la toxicidad. Las evidencias obtenidas anteriormente por nuestro grupo sobre la inducción de la muerte celular por apoptosis en hígado de ratón tratado con cocaína [13], nos han llevado a investigar sobre el papel apoptogénico de esta droga [57] y la posible relación entre los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis en hepatocitos en cultivo [48].

La muerte celular por apoptosis puede ocurrir después del tratamiento con una gran variedad de compuestos tóxicos, unas veces precediendo a la aparición de la necrosis y otras coexistiendo con ella. Dependiendo de las células, la dosis y/o los estímulos desencadenados puede observarse apoptosis, necrosis o ambos fenómenos [8].

Para verificar la existencia de muerte celular por apoptosis, hemos realizado diversos ensayos, comprobando por una parte la presencia de células apoptóticas y necróticas en nuestros cultivos por observación directa al microscopio de fluorescencia de las placas del cultivo de los hepatocitos tratadas con el fluorocromo Hoechst 33258, y por otro lado la existencia de fragmentación del DNA por electroforesis en geles de agarosa. Aunque durante la necrosis se ha observado que también se produce fragmentación del DNA, ésta es aleatoria, ya que no aparece en los geles la gradación escalonada de las bandas típica de la apoptosis.

El análisis por microscopía confocal reveló la existencia de células apoptóticas cuya aparición parecía relacionarse con la producción de radicales libres de oxígeno. Esta observación es consistente con el hecho de que el estrés oxidativo da lugar a la inducción de actividad endonucleasa aportando evidencias de una relación estrecha entre los radicales libres y la iniciación de la apoptosis [30, 66, 80].

La apoptosis se puede demostrar claramente si además de mostrar la típica escalera del DNA en el gel de agarosa, analizamos las imágenes obtenidas al fotografiar las células después de teñir su DNA con un fluorocromo, ya que coincidiendo con la opinión de otros autores, las características universales que siempre se pueden observar durante la apoptosis son los cambios morfológicos sufridos por las células, tales como

la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo [15, 38]. Tales cambios son difíciles de reconocer a nivel histológico, pero en células procedentes de los cultivos que nosotros hemos utilizado, pueden apreciarse con facilidad los cambios descritos. Las imágenes de las células al microscopio de fluorescencia muestran la presencia de células apoptóticas en todos los cultivos tratados con el tóxico, y el aumento de células necróticas al elevar la concentración de cocaína. Por otra parte, la electroforesis en gel de agarosa del DNA muestra una fragmentación máxima frente a concentraciones 100 μM de la droga.

Estos resultados, que evidencian la capacidad apoptogénica de la cocaína sobre cultivos de hepatocitos de rata, se vieron reforzados con los obtenidos por citometría de flujo, por cuantificación del pico hipodiploide (<2C) obtenido cuando los hepatocitos incubados con cocaína se analizaron por su contenido en DNA y su ploidía después de ser tratados con yoduro de propidio. De esta manera pudimos obtener otro parámetro que nos permitió evaluar las variaciones en la proporción de células con un contenido hipodiploide de DNA en cultivos de hepatocitos como consecuencia de la exposición a las diferentes concentraciones de cocaína del presente trabajo. Aunque la hipodiploidía puede acompañar o no a la apoptosis, todos los ensayos coincidieron. Por análisis de la fragmentación del DNA en gel de agarosa, por observación directa de las células teñidas con Hoechst 33258, y por cuantificación de la población hipodiploide se ha llegado a la conclusión de que la máxima apoptosis inducida por cocaína se consiguió a concentraciones de 100 μM .

Los histogramas de DNA de los hepatocitos expuestos a las concentraciones más elevadas de cocaína no indican una degeneración de las células en el ciclo celular, puesto que todavía es aparente la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo, en respuesta a la exposición a cocaína 2 mM. De los resultados citométricos obtenidos se desprende también la existencia de un porcentaje considerable de células apoptóticas en los controles. Esto puede reflejar el hecho de que los cultivos no contengan todas las citoquinas y los factores de crecimiento apropiados. Sin embargo, coincide con otros estudios que demuestran que los hepatocitos en cultivo sufren un proceso de ruptura del DNA muy lento, pero que se incrementa con la duración del cultivo [12]. Otro aspecto a tener en cuenta para explicar el destacado porcentaje de células apoptóticas en los controles es el pretratamiento con fenobarbital. El fenobarbital, al igual que otros promotores tumorales, cuando se administra a animales en las condiciones del presente trabajo, da lugar a una hiperplasia en hígado. Esta hiperplasia desaparece al cesar el tratamiento con fenobarbital, debido a que las células mueren por apoptosis [13]. Quizás los hepatocitos en cultivo sufren la apoptosis al carecer de fenobarbital en el medio. Experimentos con hepatocitos de ratas no pretratadas con fenobarbital nos aclararán estas dudas.

Relacionamos los resultados de la actividad de LDH en el medio con los obtenidos al analizar por citometría de flujo la población con un contenido hipodiploide de DNA, teniendo en cuenta que la muerte celular por apoptosis se caracteriza por el mantenimiento de las propiedades de la membrana, mientras que la liberación de enzimas citosólicas al medio es característica de la necrosis. De esta forma, el aumento brusco de la actividad de LDH en el medio de cultivo que se registra a partir de concentraciones de 250 μM de cocaína ha de ser debido al aumento de la muerte celular por necrosis, mientras que en puntos inferiores a esta concentración la muerte de las células se produciría fundamentalmente por apoptosis. Efectivamente, el porcentaje de células

mueras por apoptosis detectado por citometría de flujo fue incrementándose progresivamente hasta alcanzar el máximo a concentraciones de cocaína de 50-100 μM , a partir de las cuales la proporción de células apoptóticas fue disminuyendo. Podríamos concluir que como resultado de la administración de dosis bajas de cocaína se induce la apoptosis, mientras que el resultado del tratamiento con el mismo tóxico pero a dosis más altas es la necrosis. Refiriéndonos concretamente a las concentraciones de cocaína utilizadas en este trabajo, la apoptosis tiene lugar predominantemente en cultivos tratados con dosis de cocaína hasta 100 μM , mientras que la necrosis se produce en presencia de concentraciones superiores a 250 μM . Esta concentración de cocaína coincide con una disminución de la población de hepatocitos hipodiploides, y con un incremento considerable de la liberación de LDH al medio.

Estas observaciones refuerzan la noción de que el nivel y la duración del estímulo lesivo, más que su naturaleza, determinan el modo de muerte [52]. El daño celular por peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones permite que la célula active los mecanismos que conducen a la muerte celular por apoptosis, mientras que a altas concentraciones se induce la muerte por necrosis en el mismo tipo celular [50].

Con el objeto de profundizar sobre los mecanismos responsables de la respuesta celular frente a la generación de especies reactivas de oxígeno, se está llevando a cabo en el momento presente el análisis de las variaciones en la expresión génica y la actividad de diversos sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Estas investigaciones, unidas a la acción de diferentes antioxidantes exógenos nos ayudarán a conocer más sobre el papel de las especies reactivas de oxígeno en la hepatotoxicidad de la cocaína.

5. CONCLUSIONES

1. Los hepatocitos de rata, inducidos con fenobarbital y precultivados durante 24 horas, representan un modelo óptimo para estudiar *in vitro* los mecanismos celulares responsables de la hepatotoxicidad de la cocaína. El efecto citotóxico de la droga, evaluado por la liberación de lactato deshidrogenasa al medio, es dependiente tanto de la concentración de cocaína (0-2 mM) como de la duración del tratamiento (2, 10 y 24 horas).

2. Como resultado de la exposición de las células a diferentes concentraciones de cocaína y durante 24 horas de incubación se generan especies reactivas de oxígeno, cuya producción, evaluada por citometría de flujo, muestra los valores máximos a concentraciones de cocaína entre 5 y 50 μM . Por microscopía confocal pudo detectarse la aparición de especies reactivas de oxígeno en células tratadas con diclorofluorescina.

3. La exposición a cocaína *in vitro* conduce a la muerte celular (apoptosis y/o necrosis). La capacidad apoptogénica de la cocaína presentó un máximo a concentraciones de cocaína de 50-100 μM . La apoptosis fue detectada por evaluación de la fragmentación del DNA, por visualización por microscopía de fluorescencia de la condensación de la cromatina y por cuantificación de la población hipodiploide.

4. De estos resultados se sugiere que existe una relación estrecha entre los niveles intracelulares radicales de oxígeno generados en la biotransformación de la cocaína y la apoptosis.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Arends MJ, Morris RG y Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* **136**, 593-608 (1990).
2. Barroso-Moguel R, Mendez-Armenta M y Villeda-Hernández J. Experimental nephropathy by chronic administration of cocaine in rats. *Toxicology* **98**, 41-46 (1995).
3. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC y Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**, 190-1917 (1983).
4. Benuck M, Reith MEA, Sershen H, Wiener HL y Lajtha A. Oxidative metabolism of cocaine. Comparison of brain and liver (42822). *Proc Soc Exp Biol Med* **190**, 7-13 (1989).
5. Billman GE. Cocaine: A review of its toxic actions on cardiac function. *Critical Reviews in Toxicology* **25**, 113-132 (1995).
6. Boelsterli UA, Lanzotti A, Göldlin C y Oertle M. Identification of cytochrome P-450 IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **20**, 96-101 (1992).
7. Boelsterli UA, Wolf A y Goldling C. Oxygen free radical production mediated by cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaethylene, in rat hepatocytes. *Hepatology* **18**, 1154-1161 (1993).
8. Bortner CD, Oldenburg NBE y Cidlowski JA. *Trends Cell Biol* **5**, 21-26 (1995).
9. Boyer CS y Peterson DR. Potentiation of cocaine-mediated hepatotoxicity by acute and chronic ethanol. *Alcohol Exp Res* **14**, 28-31 (1990).
10. Boyer CS y Peterson DR. Hepatic biochemical changes as a result of acute cocaine administration in the mouse. *Hepatology* **14**, 1209-1216 (1991).
11. Bursch W, Oberhammer F y Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *TIPS* **13**, 245-251 (1992).
12. Cain K, Salmaan H, Hussain I, Covet C, Qin H y Oberhammer F. A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocytes undergo a time depended increase in DNA cleavage and chromatin condensation which is augmented after TGF-B1 treatment. *Cytometry* **23**, 312-321 (1996).
13. Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L. Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 992-1001 (1994).
14. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* **14**, 126-130 (1993).
15. Collins R, Harmon B, Gobe G y Kerr J. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criteria for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* **61**, 451-453 (1992).
16. Connors S, Rankin DR, Gandolfi AJ, Krundieck CL, Koep LJ y Brendel K. Cocaine hepatotoxicity in cultured liver slices: a species comparison. *Toxicology* **61**, 171-183 (1990).
17. Cotgreave IA, Moldeus P y Orrenius S. Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **28**, 189-212 (1988).
18. Dallas CE y Evans DL. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* **345**, 557-558 (1990).
19. Dawson T, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B y Lemasters JJ. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* **264**, C961-C967 (1993).

20. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* **18**, 912-918 (1993).
21. Ellis RE, Yuan J y Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* **7**, 663-689 (1991).
22. Elstner EF. Oxygen radicals - biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr* **69**, 949-956 (1991).
23. Evans MA. Role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **224**, 73-79 (1983).
24. Evans MA y Harbison RD. Cocaine induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **45**, 739-745 (1978).
25. Fesus L, Thomazy V y Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* **224**, 104-108 (1987).
26. Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E y Piacentini M. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* **245**, 150-154 (1989).
27. Filipinski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M y Walker PR. Periodicity of DNA folding in higher order chromatine. *EMBO J* **9**, 1319-1327 (1990).
28. Galway MP. Neurochemical interactions of cocaine with dopaminergic system. *TIPS* **9**, 451-454 (1988).
29. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcriptional nuclear factor-kB: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Molecular Pharmacology* **48**, 825-834 (1995).
30. Gardner AM, Xu F-H, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y y Lichtenstein A. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **22**, 73-83 (1997).
31. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A y Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **267**, 6654-6663 (1992).
32. Gascó P. Hepatotoxicidad inducida por cocaína en ratón. Alteraciones funcionales, bioquímicas y morfológicas durante la necrosis y regeneración hepática. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense. Madrid. pp. 1-227 (1993).
33. Gascó P, Fernández-Simón L, Martín-Sanz P, Díez-Fernández C, Sancho M, Sanz N y Cascales M. Hepatotoxicidad de la cocaína. Parámetros bioquímicos y morfológicos de la lesión celular en ratón. *Rev Toxicol* **11**, 105-111 (1994).
34. Gawin FH y Kleber HD. Cocaine abuse treatment. *Arch Gen Psychiatry* **41**, 903-909 (1984).
35. Giannakis C, Forbes IJ y Zalewski PD. Ca²⁺/Mg²⁺-dependent nuclease: tissue distribution, relationship to internucleosomal DNA fragmentation and inhibition by Zn²⁺. *Biochem Biophys Res Commun* **52**, 504-510 (1991).
36. Göldlin C y Boelsterli UA. Reactive oxygen species and non-peroxidative mechanisms of cocaine-induced cytotoxicity in rat hepatocyte cultures. *Toxicology* **69**, 79-91 (1991).
37. González FJ. The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol Rev* **40**, 243-288 (1989).
38. Green D, Bissonnette R y Cotter T. Apoptosis and cancer. En: *Important advances in oncology 1994* (eds V DeVita, S Hellman y S. Rosenberg) pp 37-52, Philadelphia, Lippincott (1994).
39. Guengerich FP y Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by

- human cytochrome p-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* **4**, 391-401 (1991).
40. Haanen C y Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflammation* **4**, 5-15 (1995).
 41. Halliwell B, Gutteridge JMC y Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now. *Clin Med* **119**, 598-620 (1992).
 42. Hockenbury D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* **146**, 16-19 (1995).
 43. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83-86 (1996).
 44. Jennissen HP. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *Eur J Biochem* **231**, 1-30 (1995).
 45. Jover R, Ponsoda X, Gómez-Lechón MJ y Castell JV. Cocaine hepatotoxicity: two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non-induced rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **46**, 1967-1974 (1993).
 46. Kloss MW, Rosen GM y Rauckman EJ. Cocaine-mediated hepatotoxicity. A critical review. *Biochem Pharmacol* **33**, 169-173 (1984).
 47. Krebs HA, Cornell NE, Lund P y Hems R. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism* (eds F Lundsquist y N Tygstrup) pp 726-750, Copenhagen, Munksgaard (1974).
 48. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebina H, Kato S y Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* **25**, 368-378 (1997).
 49. LeDuc BW, Sinclair PR, Shuster L, Sinclair JF, Evans JE y Greenblatt DJ. Norcocaine and N-hydroxynorcocaine formation in human liver microsomes: role of cytochrome P-450 3A4. *Pharmacology* **46**, 294-300 (1993).
 50. Lennon SV, Martin SJ y Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* **24**, 203-214 (1991).
 51. Majno G y Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15 (1995).
 52. Martin SJ y Cotter TG. Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells *in vitro* induces apoptosis. *Int J Radiat Biol* **59**, 1001-1016 (1991).
 53. Masini A, Gallesi D, Giovannini F, Trenti T y Ceccarelli D. Membrane potential of hepatic mitochondria after acute cocaine administration in rats. The role of mitochondrial reduced glutathione. *Hepatology* **25**, 385-390 (1997).
 54. Mattson MP, Barger SW, Begley JG y Mark RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. En: *Cell death, methods in Cell Biology* (eds LM Schwartz y BA Osborne) **Vol 46**, pp 187-216, Academic Press (1995).
 55. McGahon AS, Matin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK y Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. En: *Methods in Cell Biology* (eds LM Schwartz y BA Osborne) **Vol 46**, pp 153-185. Academic Press (1995).
 56. Murata M, Monden M, Umeshita K, Nakano H, Kanai T, Gotoh M y Mori T. Role of intracellular calcium in superoxide-induced hepatocyte injury. *Hepatology* **19**, 1223-1228 (1994).
 57. Nassogne MC, Louahed J, Evrard P y Courttoy PJ. Cocaine induces apoptosis in cortical neurons of fetal mice. *J Neurochemistry* **68**, 2442-2450 (1997).
 58. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyerherzen R, González FJ, Coon MJ, Gunsalus

- IC, Gotoh O, Okuda K y Nebert DW. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA* **12**, 1-51 (1993).
59. Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S. The role of Ca^{2+} in cell killing. *Chem Res Toxicol* **3**, 484-494 (1990).
60. Nicotera P, Hartzell P, Davis G y Orrenius S. The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett* **209**, 139-144 (1986).
61. Pellinen P, Honkakoski P, Stenbäck F, Niemitz M, Alhava E, Pelkonen O, Lang M y Pasanen M. Cocaine N-demethylation and the metabolism-related hepatotoxicity can be prevented by cytochrome P-450 3A inhibitors. *Eur J Pharmacol Env Toxicol Pharmacol* **270**, 35-43 (1994).
62. Pessayre D. Mecanisme des hepatites medicamenteuses. *Gastroenterol Clin Biol* **19**, B47-B56 (1995).
63. Peterson FJ, Knodell RG, Lindemann NJ y Steele NM. Prevention of acetaminophen and cocaine hepatotoxicity in mice by cimetidine treatment. *Gastroenterology* **85**, 122-129 (1983).
64. Powell CJ, Connolly AK y Charles SJ. Shifting necrosis: butylated hydroxytoluene (BHT) and phenobarbital move cocaine-induced hepatic necrosis across the lobule. *Toxicol Letters* **55**, 171-178 (1991).
65. Powell CJ, Charles SJ y Mullervy J. Cocaine hepatotoxicity: a study on the pathogenesis of periportal necrosis. *Int J Exp Pathol* **75**, 415-424 (1994).
66. Powis G, Briehl M y Oblong J. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther* **68**, 149-173 (1995).
67. Rauckman EJ, Rosen GM y Cavagnaro J. Norcocaine Nitroxide. A potential hepatotoxic metabolite of cocaine. *Mol Pharmacol* **21**, 458-463 (1982).
68. Roberts SM, Pounds JG y James RC. Cocaine toxicity in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Letter* **50**, 283-288 (1990).
69. Roth L, Harbison RD, James RC, Tobin T y Roberts SM. Cocaine hepatotoxicity: Influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology* **15**, 934-940 (1992).
70. Savill JS, Dransfield I, Hogg N y Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**, 170-173 (1990).
71. Schechter MD y Mehan SM. The lethal effects of ethanol and cocaine and their combination in mice: implications for cocaethylene formation. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 245-248 (1995).
72. Shuster L, Quimby F, Bates A y Thompson ML. Liver damage from cocaine in mice. *Life Sci* **20**, 1035-1042 (1977).
73. Silva MO, Roth D, Reddy KR, Fernandez JA, Albores-Saavedra J y Schiff ER. Hepatic dysfunction accompanying acute cocaine intoxication. *J Hepatol* **12**, 312-315 (1991).
74. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449 (1995).
75. Stewart DJ, Inaba T, Lucassen M y Kallow W. Cocaine metabolism: Cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin Pharmacol Ther* **25**, 464-468 (1979).
76. Strichartz GR y Ritchie JM. The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. En: *Handbook of experimental pharmacology* (ed GR Strichartz) pp 21-53. Berlin. Springer Verlag (1987).
77. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).

78. Thompson ML, Shuster L y Shaw K. Cocaine induced hepatic-necrosis in mice. *Biochem Pharmacol* **28**, 2389-2395 (1979).
79. Trump BF, Berezsky IK y Cowley RA. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. En: *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia* (eds RA Cowley y BF Trump) pp 6-46. Baltimore, MD. Williams & Wilkins (1982).
80. Ueda N y Shah SV. Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* **90**, 2593-2597 (1992).
81. Vasault A. Lactate dehydrogenase. UV methods with pyruvate and NADH. En: Bergmeyer, H.U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol III. Verlag Chemie, Weinheim, pp 118-133 (1987).
82. Vindelov LL, Christensen IJ y Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* **3**, 323-327 (1983).
83. Walker PR y Sikorska M. Endonuclease activities, cromatine structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* **72**, 615-623 (1994).
84. Wanless IR. Histopathology of cocaine hepatotoxicity: report of four patients. *Gastroenterology* **98**, 497 (1990).
85. Wanless IR, Dore S, Gopinath N, Tan J, Cameron R, Heathcote EJ, Blendis LM y Levy G. Histopathology of cocaine hepatotoxicity. *Gastroenterology* **98**, 497-501 (1990).
86. Welder AA y Acosta D. Enzyme leakage as an indicator of cytotoxicity in cultured cells. En: Tyson, C.A.; Frazier, J.M., eds. *In vitro toxicity indicators. Methods in Toxicology*. Academic Press, pp 46-49 (1994).
87. Wertz IE and Hanley MR. Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS* **21**, 359-364 (1996).
88. Wilcock C, Chahwala SB y Hickman JA. Selective inhibition by bis(2-chloroethyl) methylamine (nitrogen mustard) of the Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter of murine L1210 leukemia cells. *Biochem Biophys Acta* **946**, 368-378 (1988).
89. Wrighton SA y Stevens JC. The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* **22**, 1-22 (1992).
90. Wyllie AH, Kerr JFR y Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-300 (1980).
91. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**, 139-162 (1994).

TOXICIDAD DE LA CICLOSPORINA A EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA. INFLUENCIA DE LA ETAPA DEL DESARROLLO

DAVID ANDRÉS, NURIA SANZ,
CARMEN DIEZ-FERNÁNDEZ, ASUNCIÓN ZARAGOZA,
ALBERTO ALVAREZ-BARRIENTOS y MARÍA CASCALES *

1. INTRODUCCION

La ciclosporina A (CsA) es un potente agente inmunosupresor debido a que ejerce un efecto inhibitor específico sobre la vía de transducción de señales del receptor de las células T. Esta propiedad ha sido decisiva para el éxito de la terapia de los trasplantes al reducir la incidencia de los rechazos, sin embargo, su uso clínico se encuentra limitado por sus efectos secundarios adversos que incluyen neuro, nefro y hepatotoxicidad (58). A nivel hepático, en función de la dosis y duración del tratamiento, da lugar a alteraciones bioquímicas como la elevación de la actividad fosfatasa alcalina y de los niveles de bilirrubina y sales biliares en sangre, representativos ambos de un proceso de colestasis (5). Experimentos *in vitro* han demostrado que la CsA induce en hepatocitos una situación de estrés oxidativo, disminución de tioles proteicos y peroxidación lipídica que desemboca en la muerte celular por necrosis (132). Además, la capacidad de antioxidantes, como la vitamina E o el glutatión, de inhibir la peroxidación lipídica inducida por la CsA, sugiere que los radicales libres y especies reactivas de oxígeno pueden jugar un papel importante en su hepatotoxicidad (133).

En 1969, McCord y Fridovich (81) propusieron que la formación de radicales libres de oxígeno era parte integral del metabolismo normal de las células. De hecho, en organismos aerobios el principal productor de especies reactivas de oxígeno es la mitocondria, donde se generan aproximadamente 3×10^7 radicales superóxido por mitocondria y día (98). Estos no pueden ser eliminados en su totalidad y van acumulándose progresivamente con la edad, pudiendo reaccionar con el peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, vía reacción de Fenton o Haber-Weiss, dando lugar al radical hidroxilo (OH), oxidante poderoso con gran capacidad para reaccionar con DNA, lípidos y proteínas (51). Por ello, el estado de mayor oxidación originado por la edad, puede jugar un papel importante en los mecanismos de respuesta frente a la agresión tóxica de xenobióticos, tales como la CsA.

* Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Avda. Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid.

Un requisito para la supervivencia de los organismos es contar con sistemas de defensa que impidan la formación de los radicales libres de oxígeno o que protejan a las células y tejidos de sus efectos nocivos. Mediante estos sistemas, los radicales son capturados por moléculas antioxidantes, como el glutatión, que muestran por ellos una afinidad especial, o son transformados rápidamente en especies inertes mediante la acción concertada de enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. Cuando las defensas antioxidantes disminuyen, o cuando la excesiva generación de estas especies agresivas supera la capacidad antioxidante celular, las macromoléculas sufren lesiones oxidativas que, al alterar su estructura, afectan de manera irreversible la función celular (142).

La cantidad y diversidad de condiciones patológicas que se asocian con la excesiva generación de radicales libres de oxígeno (45) ha despertado el interés de los investigadores para profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales los radicales influyen en las respuestas celulares. El hígado es el órgano más estudiado en relación con estas alteraciones, utilizándose los cultivos primarios de hepatocitos cada vez con mayor frecuencia para investigar los mecanismos de acción de compuestos hepatotóxicos, con la ventaja sobre los estudios *in vivo* de poder concretar el efecto de dichos compuestos sobre una población celular homogénea (113).

Por todo ello, en el presente trabajo se ha estudiado la influencia del desarrollo (ratas macho Wistar de 2 a 6 meses) sobre la citotoxicidad inducida por la CsA. El uso clínico de este fármaco comprende pacientes de edades muy diversas en los que habría que tener en cuenta no sólo las especies reactivas de oxígeno originadas por el tratamiento con el fármaco, sino también los niveles propios de cada individuo en función de su edad.

1.1. Farmacología de la ciclosporina

La ciclosporina A (CsA) pertenece a una familia de péptidos cíclicos producidos por un hongo, el *Tolypocladium inflatum gams*, también denominado como *Trichoderma polysporum*. Está constituida por 11 aminoácidos de naturaleza lipofílica lo que dificulta la solubilidad de la CsA en medio acuoso. Presenta un aminoácido muy especial de nueve carbonos, ubicado en la posición 1 (130). El nitrógeno de todos los grupos amido está unido a hidrógeno o está metilado y la actividad biológica es muy sensible a alteraciones en la configuración estereoquímica y a modificaciones de los residuos en las posiciones 1, 2, 3, 10 y 11. La CsA contiene un sólo residuo D-aminoácido en la posición 8 y el residuo metil-amido entre las posiciones 9 y 10 está en la configuración *cis*, en tanto que todos los demás residuos metil-amido están en la forma *trans*. (Figura A).

Debido a las propiedades de la CsA como potente agente inmunosupresor, su principal uso terapéutico va dirigido a la reducción de la incidencia de los rechazos que pudieran originarse después de un trasplante de órganos (57,58). Su efecto inmunosupresor se debe a la interferencia con las funciones normales de las células T (111), ya que inhibe la producción de interleukina-2, citoquina que interviene en la proliferación y diferenciación de las células T (39).

La activación de células T se inicia cuando antígenos específicos, presentados por las células presentadoras de antígenos (APC), se unen al receptor de las células T

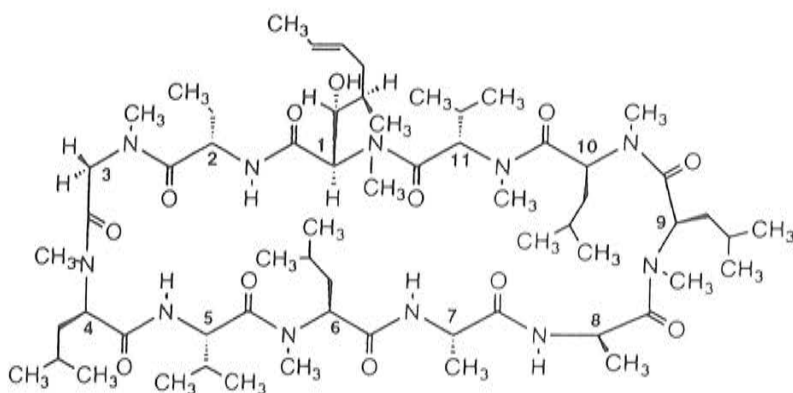


FIGURA A. Estructura de la ciclosporina A

(TCR). Así se activa una cascada de reacciones que incluye la fosforilación de un residuo de tirosina que activa la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) y con ello la hidrólisis del fosfatidil-inositol difosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ origina un aumento de Ca²⁺ citosólico responsable de la estimulación de la actividad fosfatasa dependiente de calcio de la calcineurina como paso crucial de la activación y traslocación nuclear de la subunidad citoplasmática del factor de transcripción NF-ATc (85). Por otra parte el DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que induce la subunidad nuclear de este mismo factor (NF-ATn). Otro factor de transcripción involucrado en este proceso es el NF- κ B, proteína heterodimérica constituida por las subunidades p50 y p65 y estabilizada por unión a una tercera proteína, la I κ B. La fosforilación de esta última libera el NF- κ B que se trasloca al núcleo. Tanto el complejo formado por las dos subunidades del NF-AT como el NF- κ B, se unen a la zona promotora del gen que codifica para la IL-2. La IL-2 sintetizada se libera al exterior celular uniéndose a su receptor IL-2R. El proceso de señalización mediado por esta unión implica la activación de JAK-quinasas, transductores de señal y activadores de transcripción (STATs), y la quinasa p70^{s6}, todas ellas responsables de que las células progresen de G₁ a S. (Figura B).

La ciclofilina A (CypA) es una proteína de bajo peso molecular (18 kDa) de la familia de las inmunofilinas que posee actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (121). Se trata de una molécula esferoidal consistente en ocho cadenas antiparalelas de lámina- β , dos α -hélice y una serie de bucles y giros (61). La CsA se une al centro activo de la CypA mediante los aminoácidos situados en las posiciones 1, 2, 3, 9, 10 y 11 lo que implica un cambio conformacional de *cis* a *trans* en la amida localizada entre las posiciones 9 y 10 (123). (Figura C).

Durante casi 30 años, los agentes citotóxicos permitieron efectuar con relativo éxito trasplantes de aloinjertos. Sin embargo, la introducción de la ciclosporina y su empleo en combinación con otros inmunosupresores aumentaron las posibilidades de éxito en los trasplantes de órganos, que permitió prolongar la vida a miles de pacientes cada año (9). Aunque los trasplantes que predominan son los renales, la frecuencia y el éxito de los trasplantes cardíacos, hepáticos y pancreáticos aumentan de forma progresiva (120). El trasplante de médula ósea se ha convertido en el tratamiento de elección para muchos pacientes con anemia aplásica, leucemia no linfocítica aguda y

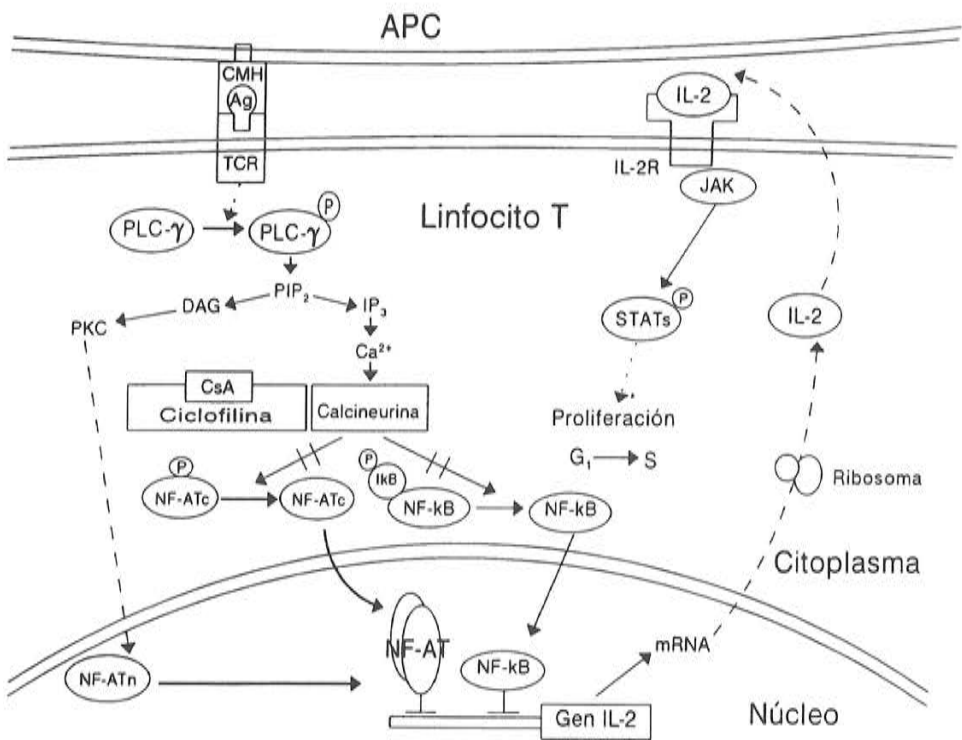
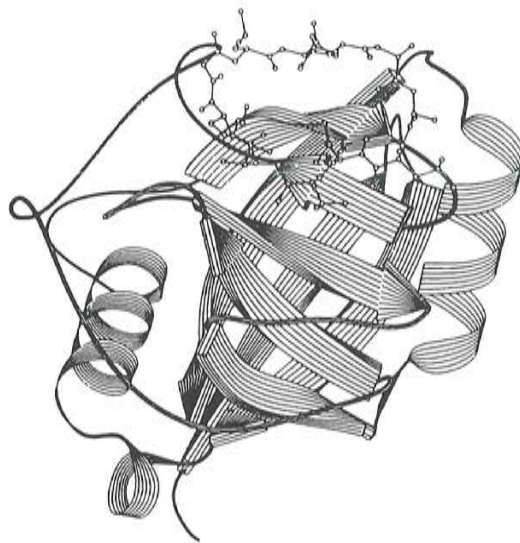


FIGURA B. Activación de células T. Mecanismo de acción de la ciclosporina A



CypA: CsA

FIGURA C. Complejo formado por la ciclosporina A y la ciclofilina A

un síndrome grave de inmunodeficiencia combinada. La CsA se emplea como fármaco alternativo del metotrexato para prevenir la evolución del rechazo del injerto en estos pacientes, aunque algunos protocolos emplean ambos agentes (119).

La CsA tiene otras propiedades que no parecen estar relacionadas con sus acciones sobre las células T y que pueden ser un reflejo de la ubicuidad en la distribución de las ciclofilinas. Una variedad de infecciones parasitarias, que incluyen la esquistosomiasis y el paludismo, responden a este compuesto, posiblemente por una acción directa sobre el parásito (82). La CsA también puede restablecer la sensibilidad de líneas celulares y de tumores experimentales resistentes a distintos agentes quimioterápicos que inducen la sobreexpresión de P-glicoproteínas (el producto del gen MDR, gen de la multiresistencia) (114) y que se emplean para el tratamiento del cáncer. Se cree que el mecanismo de este efecto no está relacionado con el mecanismo responsable de la inmunosupresión, dado que tanto los análogos activos como los inactivos de la ciclosporina pueden provocarlo (12).

1.2. Farmacocinética de la ciclosporina

Absorción

La biodisponibilidad de la ciclosporina por vía oral es relativamente baja con un amplio margen de variabilidad de unos individuos a otros (20 - 50%). Se ha demostrado que la absorción se asemeja a un proceso cinético de orden cero (dosis-independiente) más que a una cinética de orden uno (dosis-dependiente), lo que ha llevado a postular la idea de la existencia de una ventana de absorción en la zona superior del intestino delgado donde se encontraría un transportador que llevaría a cabo el paso de la ciclosporina a través de la pared intestinal (40).

Distribución

Una vez que la CsA se incorpora a la circulación sanguínea, se distribuye ampliamente debido a su naturaleza lipofílica y a la ubicuidad de la ciclofilina (96), lo que sugiere un volumen de distribución aparente relativamente alto (4 L/Kg) (33). En sangre, se une principalmente a lipoproteínas y eritrocitos (69), acumulándose también con gran avidéz en leucocitos debido al mayor contenido de ciclofilina en dichas células.

Metabolismo

La CsA se metaboliza en hígado por el citocromo P-450 3A, originando 15 metabolitos desmetilados e hidroxilados (68). Este sistema está constituido por una familia de flavoproteínas que catalizan la transferencia de electrones desde el NADPH a la hemoproteína generando el sustrato hidroxilado. La secuencia de reacciones se inicia por la unión del sustrato al citocromo y la reducción del complejo enzima-sustrato a la forma ferrosa, mediante la cit P-450 reductasa-NADPH que contiene FAD y FMN en proporción 1:1. Posteriormente se incorpora el O₂ y tras una serie de reacciones en cadena, se culminará con la ruptura de la molécula de O₂ y la monooxigenación del

sustrato. Este proceso genera radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (94). (Figura D).

Los metabolitos generados inicialmente son los derivados monohidroxilados M1 y M17 y el metabolito desmetilado M21 que constituyen el 70% de la ciclosporina encontrada en sangre y más del 90% de la encontrada en bilis de pacientes trasplantados (33). Se ha demostrado que estos metabolitos muestran un efecto inmunosupresor significativo (65).

Eliminación

La eliminación se realiza principalmente por vía biliar, aunque tan sólo el 1% de la cantidad eliminada se corresponde con el fármaco inicial (126). Debido a su baja solubilidad en medio acuoso, únicamente el 6% de la dosis administrada se excreta por orina (80).

1.3. Toxicidad de la ciclosporina

A pesar de sus efectos secundarios como hipertensión, neuro, nefro y hepatotoxicidad (97), la CsA es el agente inmunosupresor más utilizado en la terapia de los trasplantes. Según evidencias experimentales parece ser que la alteración en la homeostasis del Ca^{2+} se encuentra implicada en esta toxicidad, ya que uno de los objetivos de este fármaco es la mitocondria, orgánulo subcelular clave en la regulación de la homeostasis del calcio. La ciclosporina impide el flujo normal de salida del calcio de la mitocondria por inhibir el «poro de transición de la permeabilidad» ya que al unirse a la ciclofilina impide que ésta induzca un cambio conformacional, debido a su actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (121), de la adenina nucleótido translocasa

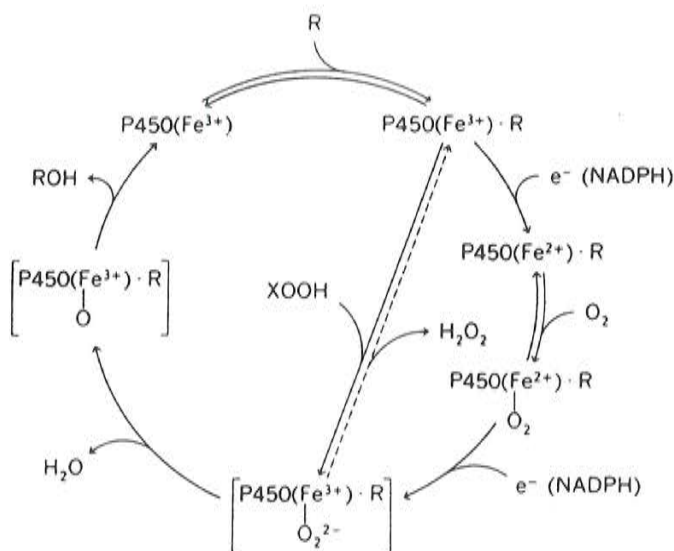


FIGURA D. Secuencia de reacciones del citocromo P-450

evitando así la apertura de este canal iónico (43). La excesiva acumulación de Ca^{2+} causa alteraciones en las funciones mitocondriales (125, 79), ya que varias deshidrogenasas mitocondriales se regulan por concentraciones micromolares de Ca^{2+} y se desactivan a concentraciones superiores. Del mismo modo se inhiben la carbamoil fosfato sintetasa, la piruvato carboxilasa y la síntesis de ATP (55). Como consecuencia de la inactivación de las deshidrogenasas, se produce un aporte insuficiente de electrones que causa la caída de los niveles de GSH mitocondrial (56). Esto explicaría que las células renales sean más sensibles que los hepatocitos a la acción de la CsA, ya que contienen unos niveles basales de GSH tres veces inferiores a los de estos últimos (105).

1.3.1. *Hepatotoxicidad de la ciclosporina*

La ciclosporina A en función de la dosis y la duración del tratamiento da lugar a alteraciones bioquímicas y estructurales en el hígado (36,1). Las alteraciones bioquímicas comprenden la elevación de la fosfatasa alcalina asociada con incrementos en los niveles de bilirrubina y sales biliares en sangre, representativos ambos de un proceso de colestasis (5). Algunos autores postulan que este proceso no se produce como consecuencia de un daño directo sobre las células hepáticas sino que, es debido a un desequilibrio en la secreción biliar originado por modificaciones del metabolismo del colesterol (18) o por la interacción del fármaco con las proteínas transportadoras de sales biliares al inhibir competitivamente la captación de colato y taurocolato, pero no de glicocolato (6). Otra hipótesis establece que la CsA es un inhibidor efectivo de la ácido biliar CoA ligasa debido a su interacción tanto con el sitio de unión de este enzima para los ácidos biliares como con el Mg^{2+} requerido para esta actividad enzimática (127).

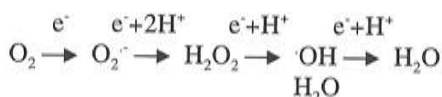
Experimentos *in vitro* han demostrado que la CsA induce una disminución en los niveles de GSH que desemboca en una situación de estrés oxidativo acompañada de una peroxidación lipídica y disminución de los grupos tiólicos proteicos, ocasionando en última instancia la muerte celular (133). La oxidación de tioles proteicos trae consigo la inhibición de la actividad de la Ca^{2+} -traslocasa lo que da lugar a un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular responsable de la activación directa de procesos catalíticos tales como la degradación de fosfolípidos, proteínas, DNA y citoesqueleto (89). Del mismo modo, la destrucción de las membranas celulares producida como consecuencia de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados induce cambios en su fluidez y modula la actividad de varios enzimas integrantes de membranas (62). Las alteraciones anteriormente mencionadas son consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno posiblemente generadas tanto a nivel del retículo endoplásmico como a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, ya que se ha demostrado un notable incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno celulares en cultivos de hepatocitos incubados con concentraciones de 10 a 50 μM (132).

1.4. Radicales libres de oxígeno

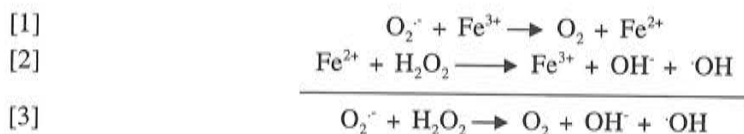
El oxígeno es un elemento esencial para la vida en su papel de aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, principal fuente de energía en los organismos aerobios. Sin embargo, la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos

se debe a que en esta utilización del oxígeno por las células se generan radicales libres. Un radical libre se define como una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo.

La vía univalente de reducción del oxígeno da lugar a tres formas «incompletamente reducidas» del oxígeno entre éste y el agua: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , que no es un radical pero puede generarlos) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$):



En oposición a puntos de vista anteriores, hoy se sabe que el radical superóxido carece de suficiente reactividad para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 da lugar al radical hidroxilo, que sí posee una elevada reactividad:



[3] es la reacción de Haber-Weiss (42), propuesta en 1934, y resultante de [1] y [2]. [2] es la reacción de Fenton, que este autor describió en 1894 (31) para explicar las propiedades oxidantes de la mezcla SO_4Fe y H_2O_2 .

El principal productor de radicales de oxígeno en los organismos aerobios es la mitocondria (71), ya que bajo circunstancias fisiológicas normales, utiliza aproximadamente el 98% del O_2 celular a nivel del citocromo a_3 , citocromo del estado IV de la cadena de transporte de electrones de la respiración mitocondrial. Un pequeño porcentaje (del 1 al 4%) del O_2 incorporado por la mitocondria, genera especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

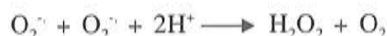
El radical superóxido se produce por la adición de un electrón a la molécula de O_2 . La membrana del retículo endoplásmico liso de la mayoría de las células animales y vegetales contiene citocromo P-450, monooxigenasa de función mixta que interviene en la oxidación de gran parte de xenobióticos, así como de sustratos propios de las células. La reacción transcurre mediante la adición de un átomo de oxígeno que se incorpora al sustrato en forma de grupo hidróxido, y la reducción del otro átomo a agua:



siendo RH el sustrato y DH_2 el donador de H, generalmente $NADPH + H^+$. El enzima NADPH citocromo P-450 reductasa proporciona los electrones requeridos por el citocromo P-450 vía $NADPH + H^+$. Tanto la forma reducida de la reductasa como la forma oxidada del citocromo P-450 pueden proporcionar electrones para reducir al oxígeno, que así produce el $O_2^{\cdot-}$. Otro sistema de producción de $O_2^{\cdot-}$ en el transporte electrónico

microsomal es el citocromo b_5 con su correspondiente NAD(P)H citocromo b_5 reductasa, que participa en la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos (54).

En solución acuosa, el anión superóxido puede comportarse como reductor o como oxidante débil (45), y es inestable debido a que es capaz de reaccionar espontáneamente consigo mismo produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (dismutación):



Por eso, su reactividad es mayor en medio hidrofóbico. El $O_2^{\cdot -}$ es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot} , pKa 4,8) (34), que presenta una reactividad mucho mayor, aunque a pH fisiológico predomina la forma no protonada. De todas formas, en las proximidades de la membrana, donde se produce el radical, el pH es mucho más bajo que en el citosol, por lo que predominará el HO_2^{\cdot} , que por su carácter no iónico podría introducirse en la membrana y desencadenar la peroxidación lipídica (28).

El peróxido de hidrógeno se forma en todos los sistemas que producen superóxido, por la dismutación espontánea o catalizada por la SOD de este radical. Los peroxisomas presentan gran capacidad de formación de H_2O_2 , ya que contienen una elevada concentración de oxidasas que pueden catalizar la reducción divalente del oxígeno molecular sin la formación del radical superóxido (26). Al igual que el superóxido, el H_2O_2 puede actuar como oxidante y reductor, y su reactividad también es baja en solución acuosa. Sin embargo, y como ya hemos mencionado anteriormente, a pesar de no ser un radical resulta muy lesivo para la célula, ya que puede atravesar las membranas biológicas (44) e inducir la formación de otros radicales, como el radical $\cdot OH$, en puntos alejados de su lugar de origen (104).

Por esto, aunque tanto el anión superóxido como el H_2O_2 tienen una reactividad baja, es de extrema importancia eliminarlos rápidamente de la célula, antes de que puedan formar otros derivados del oxígeno mucho más tóxicos. Los enzimas que desempeñan esta función cobran mayor interés sabiendo que, al contrario de lo que ocurre con el $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , no existe protección enzimática contra el $\cdot OH$.

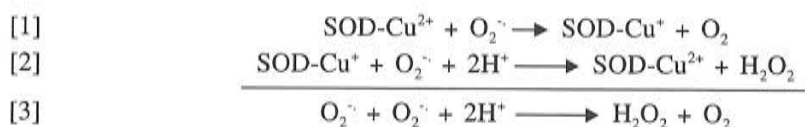
1.5. Sistemas de defensa antioxidante

Para eliminar estos radicales libres existen unos mecanismos de defensa de carácter enzimático y no enzimático, estratégicamente compartimentados en los orgánulos subcelulares, conocidos como antioxidantes, secuestrantes de radicales libres o reductores. Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Los antioxidantes no enzimáticos se pueden clasificar a su vez en dos grupos: hidrosolubles, cuyos principales representantes son el ácido ascórbico, el ácido úrico y el glutatión, y liposolubles, entre los que se incluyen la vitamina E, los carotenoides, la melatonina y el coenzima Q_{10} (53).

1.5.1. Enzimas antioxidantes

En 1969, McCord y Fridovich (81) identificaron la acción del enzima *superóxido dismutasa* (SOD), al observar que era capaz de eliminar catalíticamente al radical superóxido. La SOD es una familia de metaloenzimas con diferentes grupos prostéticos y localización intracelular variable. Existen hasta el momento tres clases de superóxido dismutasas conocidas: la cobre-zinc SOD (CuZnSOD), la manganeso SOD (MnSOD) y la hierro SOD (FeSOD) (35).

La CuZnSOD se encuentra en el citoplasma de casi todas las células eucariotas, en los peroxisomas, algo de su actividad está presente en los lisosomas y posiblemente entre las membranas mitocondriales interna y externa, así como en el núcleo. Es capaz de acelerar 10^4 veces la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ respecto a la dismutación espontánea a pH fisiológico. Tiene dos subunidades, cada una de las cuales tiene un ión cobre y un ión zinc (45). El centro activo del enzima presenta carga positiva, y así consigue atraer al $O_2^{\cdot -}$, lo que explica que la constante de la reacción sea tan elevada (138). El ión cobre, ligado al centro activo a través de los anillos de imidazol de la histidina, participa en la reacción oxidándose y reduciéndose alternativamente:



El ión zinc toma parte en el proceso con una función estabilizadora. El enzima puede ser inactivado por su producto, el H_2O_2 , que es capaz de reaccionar con él dando radicales $O_2^{\cdot -}$ y $\cdot OH$ como resultado de la inactivación. Estos radicales pueden abandonar el centro activo del enzima y reaccionar con otras moléculas de la célula (137). La CuZnSOD se inhibe por cianuro y dietilditiocarbamato que eliminan el ión cobre del centro activo del enzima.

La MnSOD se localiza en la mitocondria. Tiene cuatro subunidades proteicas que contienen manganeso en su centro activo. Durante el proceso catalítico, el manganeso va cambiando su estado redox, pero no se conoce el mecanismo exacto de la reacción. La MnSOD es mucho más hábil a la desnaturalización por calor o por reactivos químicos que la CuZnSOD y no se inhibe por cianuro o dietilditiocarbamato. Por último, la FeSOD se encuentra principalmente en procariontas, algunos protozoos y vegetales.

La *catalasa* es el enzima que moviliza el H_2O_2 de la célula para transformarlo en oxígeno y agua, según la reacción:



Es una hemoproteína que consta de cuatro subunidades proteicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo [hierro(III)-protoporfirina] unido a su centro activo. Se localiza principalmente en los peroxisomas, donde se acumula para eliminar el H_2O_2 resultante de la β -oxidación de los ácidos grasos. El mecanismo de la reacción transcurre con la formación de un complejo entre el enzima y el sustrato, complejo que después se disocia para liberar los productos.

Además de la catalasa, la protección contra el H_2O_2 la proporcionan también las *peroxidasas*, de modo que ambas enzimas pueden con frecuencia actuar conjuntamente. La más importante de estas peroxidasas en células animales es la glutatión peroxidasa, que se localiza fundamentalmente en el citoplasma, aunque también puede encontrarse en mitocondria. Contiene cuatro átomos de selenio, con los que es capaz de catalizar la reducción del H_2O_2 y de otros peróxidos, a la vez que oxida la forma reducida del glutatión (GSH) a su forma oxidada (GSSG):



Existe otra forma enzimática de glutatión peroxidasa en ciertos tejidos animales que no contiene selenio, es dimerica y sólo es capaz de eliminar hidroperóxidos orgánicos.

La catalasa y la GSH peroxidasa desempeñan papeles complementarios ya que este último enzima elimina cantidades de hidroperóxidos bajas pero producidas constantemente, mientras que la catalasa es de gran importancia en situaciones de estrés oxidativo debido a que presenta valores de la K_m y V_{max} casi tres órdenes de magnitud mayores que los de la GSH peroxidasa.

El GSH consumido por la glutatión peroxidasa puede regenerarse a través de la glutatión reductasa. Este enzima citosólico reduce el GSSG utilizando el NADPH, equivalente reductor que puede ser generado por varios sistemas de óxido-reducción dependientes del NADPH (21).



Ninguno de los enzimas descritos desempeña una función central en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno. Al contrario, una protección eficiente habrá de ser proporcionada por una coordinación adecuada entre todos los enzimas y demás sistemas antioxidantes de la célula. Por ejemplo, el aumento de la expresión de un solo enzima, la SOD, conduce, en fibroblastos de ratón, a un aumento de la sensibilidad frente a tóxicos que ejercen su efecto produciendo $O_2^{\cdot-}$ (64). Se produce una acumulación de H_2O_2 , y si su exceso no es hidrolizado por catalasas o peroxidasas, puede reaccionar con la SOD produciendo radicales $\cdot OH$. La importancia del equilibrio entre la catalasa y la SOD ha sido probada por otros autores en células epiteliales transformadas de ratón: un mínimo incremento, fisiológico, en la actividad de la CuZnSOD provoca la formación de cantidades masivas de H_2O_2 (4).

1.5.2. Antioxidantes no enzimáticos

Las propiedades antioxidantes de la *vitamina C* residen en la capacidad del anión ascorbato, la forma ionizada del ácido ascórbico, para reaccionar con los radicales $O_2^{\cdot-}$, HO_2 y $\cdot OH$ y para regenerar la vitamina E. Además de sus propiedades antioxidantes, el ascorbato también es capaz de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} y el O_2 a H_2O_2 , proporcionando los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción de Fenton ya mencionada (116). A pesar de ello, y aunque se ha demostrado que las mezclas de hierro y ascorbato estimulan la peroxidación lipídica *in vitro* (135), se pone en duda que la vitamina

C pueda actuar como oxidante bajo condiciones fisiológicas normales *in vivo* (83), llegándose a la conclusión de que concentraciones micromolares de ascorbato, junto con la presencia de iones hierro o cobre, ejercen un efecto prooxidante, mientras que concentraciones milimolares, similares a las fisiológicas, muestran un efecto sobre la peroxidación de lípidos y proteínas fundamentalmente inhibitorio (99).

El *ácido úrico* es un excelente antioxidante para el que se ha descrito la capacidad de eliminar $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, oxígeno singlete, o radicales peroxilo ($ROO\cdot$), y además puede eliminar de la solución trazas de Fe^{2+} (24), el cual, en caso de estar presente, podría actuar como estimulador potente de procesos peroxidativos.

El *glutathion*, el principal tiol no proteico celular, es un tripéptido compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicocola. Actúa como cofactor de diversos enzimas, como tampón redox y regulador de los grupos SH de las proteínas celulares, como sustrato de enzimas antioxidantes como la glutathion peroxidasa o la dehidroascorbato reductasa (enzima que regenera el ascorbato consumido), y como antioxidante no enzimático capturando radicales $\cdot OH$ y oxígeno singlete (46).

Entre los antioxidantes liposolubles, uno de los más importantes es la *vitamina E*, que incluye un grupo de cuatro tocoferoles estrechamente relacionados entre sí (29). La vitamina E es capaz de atrapar y anular las acciones del oxígeno singlete y de los radicales $O_2^{\cdot-}$, $HO_2\cdot$ y $\cdot OH$, y de bloquear las reacciones en cadena que ocurren durante la peroxidación lipídica de las membranas (84).

Los *carotenoides* son constituyentes importantes de las membranas de los cloroplastos y que representan las especies químicas más eficientes para atrapar el oxígeno singlete (10). Presentan acciones sinérgicas con la vitamina E, pero mientras los carotenoides actúan en presencia de bajas presiones de oxígeno, la vitamina E lo hace a valores elevados (27). Así mismo, la vitamina E protege de la oxidación a los dobles enlaces conjugados de los carotenos (15).

Otro representante del grupo de los antioxidantes liposolubles, que difunde rápidamente a través de la membrana interna mitocondrial debido a la presencia de 10 isoprenos en su estructura, es el *coenzima Q₁₀* o ubiquinona 50, un constituyente natural de la cadena de transporte de electrones, con capacidad de estabilizar membranas por inhibir la peroxidación lipídica. Dicha propiedad antioxidante se debe a la capacidad del ubiquinol, forma reducida de la coenzima Q₁₀ ($CoQH_2$), de reaccionar directamente con el radical superóxido y radicales alquilo y peroxilo (3).

1.6. Muerte celular: Apoptosis y Necrosis

La muerte celular es la consecuencia final del daño producido por un estímulo patológico, pero también es un fenómeno natural en la regulación y mantenimiento de la homeostasis en las células y tejidos del organismo. Así, es posible diferenciar dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis (76).

La necrosis es, generalmente, el resultado de un trauma severo y ocurre a través de una pérdida de la integridad de la membrana y liberación del contenido celular que, invariablemente, conduce a respuestas inflamatorias. La apoptosis, sin embargo, tiene

lugar principalmente en condiciones fisiológicas o como resultado de un estímulo patológico suave (70). La muerte celular por apoptosis es esencial para el desarrollo de los seres vivos (20). Ocurre en todos los estados de la organogénesis durante el desarrollo embrionario; se alterna con la mitosis durante el recambio normal de los tejidos, representando el balance entre la proliferación y la eliminación celular; se ocupa de la selección de los clones apropiados en las poblaciones de linfocitos en proliferación, destruyendo aquellos que responden a los antígenos propios; y constituye un factor decisivo en la finalización de la respuesta inflamatoria. Además, hoy se reconoce que la pérdida del control de la apoptosis juega un papel importante en enfermedades tales como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, y quizás incluso en el envejecimiento (124).

Apoptosis y necrosis pueden caracterizarse atendiendo a los cambios morfológicos que se producen dentro de las células pero también es posible diferenciar ambos procesos cuando se observan *in vivo*, tanto por su distribución como por las reacciones tisulares que los acompañan. Así, mientras que la necrosis sucede en grupos de células contiguas y suele inducir una respuesta inflamatoria aguda, la apoptosis tiene lugar generalmente en células dispersas en el tejido y no suele ir acompañada de infiltración de leucocitos. Estas y otras características de la muerte celular por apoptosis y necrosis, comparando ambos procesos, se resumen en la tabla A.

1.7. Ciclo de división celular; análisis de la ploidía y distribución de DNA por citometría de flujo

La citocinética comprende el estudio del proceso de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células individuales y poblaciones de células (30). Los estudios de citocinética se basan en el ciclo celular, que se define, como el tiempo entre el final de la mitosis de las células progenitoras, y el final de la mitosis de las células hijas.

Para conseguir la multiplicación por división, las células abandonan el estado quiescente (G_0) para entrar y proceder a través del *ciclo celular*. Esto supone una serie de etapas consecutivas que culminan en la división mitótica. El ciclo celular se divide en cuatro fases: G_1 o fase postmitótica, S o período de síntesis del DNA, G_2 o fase premitótica y M o mitosis (101). G_1 es una fase de latencia, que precede a la replicación del DNA, donde las células tienen el mismo contenido en DNA que las G_0 , pero donde tienen lugar el transporte de proteínas, una serie de cambios en la concentración intracelular de iones, el transporte de nutrientes dentro de la célula y la síntesis de enzimas específicos necesarios para la síntesis del DNA. Durante la fase S se verifica la duplicación del DNA y la síntesis de la mayoría de proteínas e histonas. La fase G_2 con dos veces el contenido G_0/G_1 de DNA es, de nuevo, una fase de latencia que precede a la mitosis sin cambios en el contenido de DNA. Aquí tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas como preparación para la mitosis, y se produce la reparación de las lesiones de DNA causadas por replicación defectuosa o por agentes genotóxicos. Finalmente, las células entran en división en la fase mitótica (M) y las células hijas vuelven a la fase G_0 (fase quiescente) o a la fase G_1 (128). Durante la transición de G_1 a G_0 ocurren algunos cambios en la estructura de la membrana celular, la síntesis proteica decrece y cesa la síntesis de RNA.

Características	Apoptosis	Necrosis
Estímulo	Fisiológico o patológico	Patológico
Origen	Pérdida de un factor de crecimiento, influencia hormonal, estímulo tóxico suave	Anoxia, daño químico, daño físico
Propiedades de adhesión	Inmediatamente perdidas	Inicialmente intactas
Primera manifestación	Reducción celular, encogimiento	Hinchamiento celular
Cambios nucleares	Condensación, cariorrexis	Cariolisis
Cromatina nuclear	Marginación, segmentación	Plegamiento nuclear
Cambios nucleolares	Intacto, degradado al final	Granulado
Integridad de membrana	Persiste durante un tiempo	Fallo temprano
Morfología superficie	Alisamiento, blebbing	Lisis
Cambios en superficie	Expresión de vitronectina y trombospodina	Ninguno
Cambios citoesqueleto	Protrusión en superficie, budding citoplasmático, formación cuerpos apoptóticos	Fragmentación, liberación de contenidos celulares
Mitocondria	Inicialmente no afectada	Hinchamiento, entrada de Ca^{2+}
RE/Aparato de Golgi	Inicialmente no afectados	Dilatados
Vacuolas	Estructuralmente intactas	Hinchadas (leaky)
Síntesis de proteínas	Puede bloquearse por actinomicina D y cicloheximida	No afectada por antibióticos
Cambios citoplasmáticos	Ca^{2+} ↑, endonucleasa ↑, transglutaminasa ↑	Ruptura de lisosomas, liberación del contenido
Cambios nucleares	p-53 ↑, bcl-2 ↓, c-myc ↑, ruptura internucleosomal, escalera de DNA	Degradación difusa, smear DNA
Células afectadas	Células individuales, células dispersas	Grupos de células contiguas, áreas tisulares
Eliminación	Englobamiento por macrófagos y células endoteliales	Inflamación en tejidos adyacentes
Formación de cicatrices	Ausente	Presente

TABLA A. *Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis (Haanen y Vermes, 1995).*

En general, la fase S, dura entre 7 y 8 horas, la G_2 , entre 2 y 4 horas y la M menos de 1 hora, mientras que la duración de la fase G_1 es la más variable. En un momento dado de muestreo de una población celular, algunas células se encuentran al comienzo y otras finalizando la replicación del DNA, de manera que la distribución de las células respecto a su contenido en DNA varía desde el contenido 2C de la fase G_0/G_1 hasta dos veces este contenido (4C) de la fase G_2/M . Normalmente, los hepatocitos, se encuentran en el estadio G_0 , es decir, no se dividen, si no es, por ejemplo, por el tratamiento con agentes mitógenos.

En las células animales la proliferación celular está regulada principalmente en fase G_1 . Al final de esta fase, en el denominado punto de restricción, las señales mitogénicas se integran y las células proliferan. El punto de restricción define un proceso de «no retorno», de manera que una vez que las células lo pasan, se comprometen a llevar a cabo un ciclo celular completo incluso si la señal mitogénica desaparece. La progresión de las células a lo largo del ciclo está controlado por las proteína quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que se activan como consecuencia de su asociación con unas subunidades reguladoras denominadas ciclinas. Las ciclinas se sintetizan en unas fases del ciclo celular, activan a la CDK correspondiente y poste-

riormente son degradadas por proteólisis. Hasta el momento se han descrito ocho CDKs (CDK1-CDK8) y ocho ciclinas (A-H), sin embargo, sólo unas cuantas de las combinaciones posibles juegan un papel en la regulación del ciclo celular. Así por ejemplo, está claro que en G_1 se activan los complejos CDK4 y CDK6 en combinación con las ciclinas D, y el de CDK2 con la ciclina E (110). La ciclina A funciona más tarde durante la fase S (17), así como en la transición G_2/M , formando complejos con CDK2 y CDK1 respectivamente. Finalmente la activación del complejo CDK1-ciclina B es necesaria para promover la entrada en mitosis, donde fosforila un gran número de sustratos que determinan la transición G_2 /metafase (87). (Figura E).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína fundamental en el ciclo de división celular, ya que interviene en el proceso de síntesis del DNA debido a que actúa como auxiliar de la DNA polimerasa δ , y a nivel de la reparación del DNA por acción conjunta con la DNA polimerasa ϵ (72). En un ciclo de división normal, la máxima expresión del PCNA se alcanza en la transición G_1/S para posteriormente disminuir en fase G_2/M (73). Sin embargo cuando las células sufren una lesión del DNA se produce un aumento del PCNA en la fase G_2 , donde tiene lugar la reparación del DNA (63). En la actualidad se considera el PCNA como uno de los mejores marcadores de proliferación celular (91), aunque su utilización como marcador de la fase S presente el inconveniente de su elevada vida media, entre 8 y 20 horas, lo que supone su posible detección no sólo en células comprometidas en dicha fase sino también en fase G_2/M (2).

La citometría de flujo se puede aplicar al estudio del ciclo celular, el cual puede ser explorado a lo largo de sus diferentes fases, marcando cada célula con una tinción específicamente ligada al DNA que permite clasificar las poblaciones celulares en G_0/G_1 , S o G_2/M . Pero su utilidad sobre el estudio de la ploidía de las células no queda ahí sino que puede detectar con rapidez si se produce una aneuploidía en la población celular que está expuesta a un agente supuestamente tóxico. Entre los numerosos métodos descritos para la tinción del DNA (22), en el presente trabajo se ha utilizado la técnica de Vindelov *et al* (129), que utiliza el yoduro de propidio como agente intercalante y analiza la distribución del DNA en 10 ó 50 x 1000 células. Este fluo-

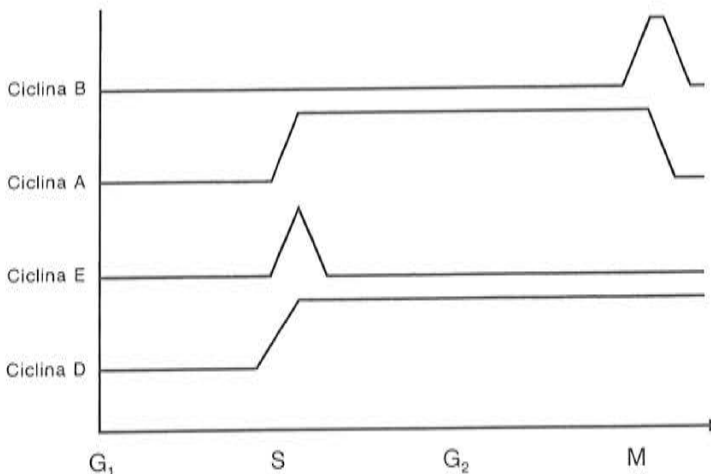


FIGURA E. Niveles de ciclinas en cada una de las fases del ciclo celular.

rocromo presenta, sobre otros, las propiedades de ser muy estable y poder ser excitado por un láser de argón estándar, producir histogramas con un coeficiente de variación bajo y emitir en la región naranja-roja del espectro, permitiendo así el análisis simultáneo del DNA y de antígenos celulares con anticuerpos marcados con isotiocianato-fluoresceína. Para los complejos formados con el yoduro de propidio, las longitudes de onda de máxima excitación y emisión son 545 y 623 nm, respectivamente. (Figura F).

1.8. Edad y desarrollo

La edad es un proceso complejo que implica cambios a nivel morfológico y bioquímico tanto en células aisladas como en órgano entero. Entre las diferentes teorías sobre la edad, la que más interés ha despertado ha sido la que responsabiliza a los radicales libres de oxígeno, generados espontáneamente en la cadena de transporte mitocondrial y acumulados progresivamente, del daño generado en el proceso del envejecimiento (47). En el caso concreto de las células parenquimales hepáticas se ha demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno excede a la inducción de su capacidad antioxidante, provocando una situación de estrés oxidativo y peroxidación (103).

Es bien conocido el hecho de que el radical $\cdot\text{OH}$ es un potente oxidante que produce lesiones a nivel del DNA (112), sin embargo estas lesiones no desembocan en alteraciones de las funciones celulares debido a la perfecta actuación de los sistemas de reparación. Por el contrario, en edades avanzadas se verifica un disminución de la

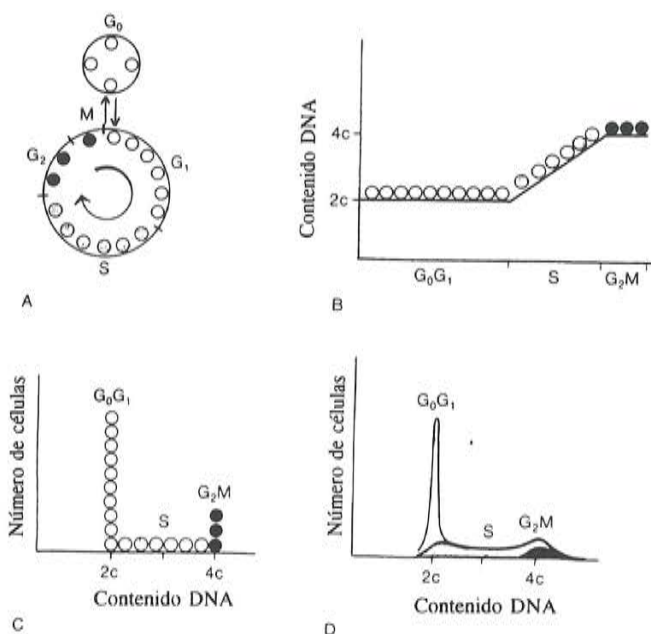


FIGURA F. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo. (A) Fases del ciclo celular. (B) Relación entre el contenido de DNA y la progresión de las fases del ciclo celular. (C) Distribución ideal del DNA (histograma) de la población ilustrada en B. (D) Distribución analítica del DNA en una población de células.

eficiencia de estos sistemas debido a una reducción de la capacidad proliferativa dando lugar a una situación de inestabilidad genómica caracterizada por mutaciones somáticas tales como sustitución, inserción, traslocación, delección, recombinación y cambio en el número de cromosomas (13). Se ha propuesto que esta pérdida de la capacidad proliferativa debida a la edad es consecuencia de una activación y/o alteración en la regulación de un inhibidor específico de la síntesis del DNA denominado Sdi1 (86). Este producto génico, también conocido como p21, WAF1, CIP1 y Cap20 (73), es un factor peptídico que inhibe la actividad de los complejos ciclina/quinasas-dependiente de ciclina (CDK) responsables de la progresión del ciclo celular en su fase G₁/S (93). Esta inhibición, que se manifiesta por una parada de las células en G₁, se debe, a que los complejos ciclina/CDK son necesarios para la fosforilación de la proteína Rb, producto del gen supresor de retinoblastoma. Esta proteína juega un papel fundamental en el envejecimiento ya que, las células senescentes tienen bloqueada la capacidad de fosforilación de Rb en respuesta a estímulos normales de crecimiento (118).

En el caso concreto del hígado de rata, el crecimiento durante el desarrollo normal se caracteriza por una progresiva poliploidización (38), y que en edades avanzadas irá acompañado de una disminución de la fracción de hepatocitos comprometidos en fase de síntesis. Los hepatocitos fetales de rata y los obtenidos durante las 3 primeras semanas de vida son en su mayor parte mononucleares diploides y así se mantienen durante los 3 primeros meses de vida; a partir de este punto, comienza el proceso de poliploidización con la aparición sucesiva de células tetraploides y octoploides, siendo el 50-70% de los hepatocitos adultos, mononucleares tetraploides (122).

Si la producción de radicales libres es el factor clave que relaciona el daño oxidativo con el envejecimiento, es de esperar que éste se refleje directamente y en primera instancia a nivel de las propias mitocondrias. Existen varias características de las mismas que nos inducen a pensar en su contribución al envejecimiento como que, en ellas se consume el 98% del oxígeno, el DNA mitocondrial está tan empaquetado que todo él codifica, carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo y su reparación es mínima si se compara con la del DNA nuclear. Además, las membranas mitocondriales al ser ricas en ácidos grasos altamente insaturados son muy susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (7). De hecho, las especies más longevas como son algunos pájaros o incluso el hombre han demostrado tener una menor proporción de ácidos grasos insaturados de 4 o más dobles enlaces por sustitución de araquidónico por linoleico, lo cual influye en la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones y con ello en la disminución de la producción de radicales libres (90). Con la edad se incrementan los niveles del mutágeno 8-desoxiguanidina, disminuyen los niveles de ácidos grasos poliinsaturados, se producen transcripciones anómalas, descienden el complejo I y IV de la cadena de transporte electrónico, únicos complejos codificados por el DNA mitocondrial a diferencia de los II y III codificados por el DNA nuclear, y se produce una pérdida de la producción energética con el consiguiente incremento en los niveles de oxidantes al reaccionar los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas con grupos amino libres (25).

Otro aspecto a tener en cuenta es el estudio de los efectos de la edad sobre la hepatotoxicidad de los xenobióticos, ya que la frecuencia de las lesiones hepáticas puede variar considerablemente con el paso del tiempo. La respuesta tóxica a muchos agentes químicos depende de su biotransformación a metabolitos reactivos (tioacetamida, paracetamol, cocaína, etc) o no reactivos (fenobarbital, morfina, etc). En el

envejecimiento parece ser que se incrementa la sensibilidad al efecto hepatotóxico de los xenobióticos (106). Se sabe que la edad afecta a los enzimas microsómicos que dependen del citocromo P-450 (99), pero mientras unos autores describen que el sistema microsómico oxidasa de función mixta disminuye por efecto de la edad (107), otros describen el efecto contrario (77). La disponibilidad del glutatión para la formación de conjugados disminuye con la edad, lo cual eleva la hepatotoxicidad de fármacos que dependen del glutatión para su detoxificación (115). Otros estudios han descrito que la expresión génica de la SOD y la catalasa, los enzimas directamente encargados de eliminar el radical superóxido y el H_2O_2 , va siendo menor a medida que transcurre la edad, mientras que la glutatión peroxidasa se incrementa en el mismo rango (75).

Experimentos previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto, en hígado de rata, que durante el desarrollo (2 a 6 meses) se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno desembocando en un descenso del cociente GSH/GSSG, es decir, un estado de mayor oxidación celular acompañado de un aumento de los sistemas antioxidantes endógenos Mn SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Esta inducción enzimática, aunque no es capaz de evitar la alteración del estado redox, sin embargo es suficiente para prevenir el daño a nivel de proteínas y la peroxidación lipídica (102).

1.9. Objetivos

Las células hepáticas durante el desarrollo sufren modificaciones en su capacidad funcional que pueden conllevar a una mayor incidencia de reacciones adversas producidas por efecto de fármacos. Esto es debido a que las especies reactivas de oxígeno que se forman espontáneamente en la respiración mitocondrial se acumulan progresivamente con la edad, y a ellas se unen las especies reactivas de oxígeno generadas por los xenobióticos. En nuestro caso, el agente citotóxico utilizado ha sido la ciclosporina A ya que por un lado conocemos los acontecimientos oxidativos que induce en los hepatocitos y por otro es un fármaco utilizado en multitud de trasplantes realizados a personas de edades muy variadas.

Por ello, mediante el uso de un modelo experimental de citotoxicidad inducida en cultivos primarios de hepatocitos de 2 y 6 meses sometidos a concentraciones crecientes de ciclosporina A, nos propusimos los objetivos siguientes:

- A. Establecer las modificaciones en la citotoxicidad inducida por la ciclosporina A durante el desarrollo frente a variables de concentración y tiempo de incubación.
- B. Investigar las diferencias en los niveles de los radicales libres de oxígeno en la citotoxicidad de la ciclosporina A en cultivos de hepatocitos de ratas de 2 y 6 meses.
- C. Determinar las variaciones en la expresión génica de los sistemas enzimáticos implicados en la defensa de los hepatocitos frente al ataque oxidativo (SOD y CAT), entre ratas jóvenes y adultas ocasionadas por la exposición a ciclosporina A.

- D. Estudiar la influencia de la ciclosporina A en la progresión de las células a lo largo del ciclo celular durante el desarrollo.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de 2 y 6 meses (200-250 g y 350-400 g, respectivamente) de la raza Wistar. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura, con libre acceso a pienso de la casa comercial Sanders S.A. y agua.

2.2. Obtención de hepatocitos y cultivos celulares

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo por perfusión del hígado *in situ* con medio Hepes (Hepes 20 mM, KCl 5 mM, SO_4Mg 1 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5 mM, ClNa 150 mM y glucosa 10 mM) con colagenasa, de acuerdo con el método clásico de Krebs *et al* (64) y modificado por Seglen (109) que permite obtener hepatocitos con un elevado porcentaje de viabilidad.

La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante tinción de exclusión con una solución de Azul de Tripán (preparada al 0,2% en suero salino). Las células muertas o con la membrana plasmática dañada aparecen teñidas al observarlas al microscopio óptico, mientras que las que permanecen vivas y mantienen su membrana íntegra no incorporan el colorante al interior de la célula y aparecen sin teñir. El recuento de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima cuando dió valores superiores al 90%.

Las células obtenidas se cultivaron en placas de 60-mm a una densidad de 7.1×10^4 células/cm² en 3 ml de medio DMEM suplementado con penicilina, estreptomina y gentamicina a una concentración de 50 mg/ml (DMEM completo) y 10% FCS (suero fetal de ternero). Tras un período de tres horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂/95% aire, el medio fue reemplazado por DMEM completo con FCS al 2% con las diferentes concentraciones de CsA (0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50 μM) durante períodos de 3, 18 y 24 horas.

2.3. Observación morfológica

Las características morfológicas de los hepatocitos controles y cultivados con una concentración de ciclosporina A 50 μM, fueron observadas por microscopía con un objetivo 40X.

2.4. Análisis por citometría de flujo y microscopía confocal de la producción de radicales libres de oxígeno

La producción intracelular de radicales libres de oxígeno se determinó usando los compuestos 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA) (8) e hidroetidina

(HEt) (100). La DCFH-DA tiene la particularidad de atravesar la membrana celular, dado su carácter no polar. Las células viables son capaces de desacetilar el compuesto dando lugar a la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), compuesto no fluorescente, estable algunas horas y que al ser polar queda atrapado en el interior de la célula. Este intermediario reacciona cuantitativamente con H_2O_2 y peróxidos de bajo peso molecular intracelulares produciendo el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCF). Por su parte, la hidroetidina es un derivado reducido del etidio capaz de atravesar la membrana de las células vivas, este fluorocromo presenta una fluorescencia azul en el citoplasma que cambia a roja cuando se intercala en el DNA tras sufrir un proceso de deshidrogenación ocasionado por el O_2^- .

2.5. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Los hepatocitos de ratas se cultivaron con diversas concentraciones de CsA por el procedimiento descrito en el apartado 2.2 de Métodos. Mediante la utilización del citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un láser de argón de 15 mW, se llevó a cabo el estudio a nivel celular del contenido y distribución del DNA. Este parámetro se considera de gran utilidad para determinar la cito y genotoxicidad de los xenobióticos (23). Las células se analizaron utilizando un test suministrado por Bio-Rad basado en los métodos de Vindelov *et al* (129) y Pellicciari *et al* (91).

2.6. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La determinación de la lactato deshidrogenasa se realizó en muestras del cultivo y del sobrenadante recogidas a distintos tiempos (3, 18 y 24 horas) tras la incubación de los hepatocitos con CsA.

La actividad de este enzima (EC 1.1.1.27.), como parámetro de daño irreversible de la membrana y muerte celular, se determinó espectrofotométricamente en el medio de cultivo y en el interior celular midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD^+ en la reacción de reducción del piruvato a lactato (11).

2.7. Determinación de proteínas

Las proteínas se evaluaron por el método de Bradford (14) utilizando albúmina de suero bovino como patrón y reactivo de Coomassie. Este método se basa en la reacción, por fuerza iónica, entre grupos sulfonados ácidos presentes en el azul Coomassie y grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina, de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 620 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína.

2.8. Aislamiento de RNA y análisis por Northern-blot de enzimas antioxidantes

El RNA total de 2×10^6 hepatocitos se extrajo siguiendo el método de tiocianato guanidina (19). Tras la electroforesis en gel de agarosa al 0,9% con 0,66M de formaldehído, el RNA se transfirió a membranas Gene Screen TM, determinando los niveles de mensajero utilizando los cDNA de Mn-, Cu,Zn-SOD y catalasa marcados con $a^{32}P$ -dCTP mediante el kit de multiprimer DNA-labeling. La cuantificación de las películas se llevó a cabo mediante densitometría utilizando como sonda de normalización la ribosomal 18S rRNA.

2.12. Métodos estadísticos

Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media (SEM) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por duplicado o cuadruplicado de un número variable de experimentos que se especifican en cada caso. Las comparaciones se efectuaron mediante el análisis de la t de Student. La significación estadística se estableció en términos de toxicidad frente a los respectivos controles (a) y en términos de estadio adulto frente a joven (b), y se definió como $p < 0,005$.

3. RESULTADOS

3.1. Efectos citotóxicos de la ciclosporina A en cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses

La liberación de enzimas citoplasmáticos por parte de las células dañadas al medio de cultivo ha demostrado ser un método muy útil para la evaluación de la toxicidad en cultivos primarios, que se basa en la capacidad de la membrana plasmática de retener los enzimas celulares. Este es el caso de la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima exclusivamente citosólico, cuya liberación al medio de cultivo tras la exposición a xenobióticos se relaciona directamente con la ruptura de la membrana plasmática, fenómeno característico de la muerte celular por necrosis.

Muestras de 2×10^6 de hepatocitos, aislados de ratas de 2 y 6 meses, se suspendieron y cultivaron en 3 ml de DMEM con concentraciones crecientes de ciclosporina A (0 - 50 μ M) midiendo las variaciones experimentadas en la actividad de la LDH en el medio al cabo de 3, 18 y 24 horas de incubación. Como puede observarse en los resultados obtenidos en la Tabla 1, el efecto citotóxico se incrementa a medida que aumenta la concentración de la CsA y el tiempo de incubación. Ello produce en ambas edades un incremento de la liberación de LDH al medio, de modo que el efecto citotóxico resultó ser dependiente tanto de la dosis como del tiempo de incubación.

A las 3 horas de incubación, no se detectaron diferencias significativas respecto al control en ninguna de las dos edades. A las 18 horas, en hepatocitos de rata de 2 meses no se modificó esta situación, pero en los de 6 meses se registraron diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 5 μ M que alcanzaron a 50 μ M valores de un 42,9% frente a un 19,6% del control correspondiente. En este mismo período de incubación, se observaron diferencias significativas entre ambas edades

CsA (μM)	3 horas		18 horas		24 horas	
	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
0	6,0 \pm 0,4	7,8 \pm 0,6	12,3 \pm 0,9	19,6 \pm 1,8	16,2 \pm 0,9	19,8 \pm 1,2
0,5	6,4 \pm 0,5	7,7 \pm 0,7	14,3 \pm 1,6	28,0 \pm 3,0 ^b	21,3 \pm 1,9	31,4 \pm 4,1
1	6,7 \pm 0,5	7,9 \pm 0,8	16,9 \pm 1,8	30,2 \pm 3,2 ^b	22,3 \pm 2,0	37,1 \pm 9 ^{ab}
5	6,7 \pm 0,6	7,9 \pm 0,7	19,2 \pm 1,8	37,3 \pm 3,3 ^{ab}	25,0 \pm 2,0	38,9 \pm 3,2 ^{ab}
10	6,9 \pm 0,5	8,2 \pm 0,9	17,6 \pm 1,7	37,4 \pm 3,5 ^{ab}	29,4 \pm 2,3 ^a	42,0 \pm 3,9 ^{ab}
25	7,0 \pm 0,6	9,0 \pm 0,7	18,2 \pm 1,7	42,3 \pm 3,9 ^{ab}	32,1 \pm 2,8 ^a	44,9 \pm 4,0 ^{ab}
50	7,1 \pm 0,8	9,0 \pm 0,9	19,4 \pm 2,0	42,9 \pm 4,3 ^{ab}	33,5 \pm 3,0 ^a	45,5 \pm 4,0 ^{ab}

TABLA 1. Liberación de LDH al medio de cultivo. La actividad de la lactato deshidrogenasa se determinó en el medio de cultivo, tomando muestras a las 3, 18 y 24 horas de incubación con las distintas concentraciones de CsA. Los valores obtenidos se expresan como porcentaje de actividad del enzima liberado al medio. Los resultados son media de tres placas procedentes de tres experimentos representativos. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

desde la concentración de 0,5 μM (28,0 \pm 3,0 versus 14,3 \pm 1,6, $p < 0,005$ en hepatocitos de rata de 6 y 2 meses respectivamente) hasta la concentración de 50 μM (42,9 \pm 4,3 frente a 19,4 \pm 2,0 $p < 0,005$). A las 24 horas de incubación, tanto los hepatocitos procedentes de ratas de 2 meses como los de ratas de 6 meses, mostraron diferencias significativas frente a sus controles respectivos a partir de las concentraciones de 10 y 1 μM respectivamente. La comparación de los datos obtenidos de hepatocitos de ratas adultas frente a los de animales jóvenes, mostró diferencias significativas desde la concentración de 1 μM (37,1 \pm 3,9 frente 22,3 \pm 2,0, $p < 0,005$) disminuyendo esta diferencia a la concentración de 50 μM (45,5 \pm 4,0 frente a 33,5 \pm 3,0).

En vista de estos resultados, consideramos las 24 horas como el tiempo idóneo de cultivo (Figura 1) que permite detectar con mayor amplitud las diferencias dependientes tanto de la dosis como de la edad, capacitándonos para estudiar comparativamente el mecanismo de toxicidad y las alteraciones en la función celular inducidas por dicho fármaco durante el desarrollo.

Como la liberación de la LDH al medio implica la ruptura de la membrana celular, realizamos un estudio morfológico por microscopía confocal. En la Figura 2 se observa que las células de los cultivos control, tanto de 2 como de 6 meses, presentan la membrana citoplasmática íntegra y muestran tendencia a agruparse y a adquirir forma poligonal para simular la estructura originaria del parénquima hepático, mientras que, las células incubadas con CsA 50 μM aparecen redondeadas y aisladas mostrando una pérdida de la integridad celular. Hay que destacar que la intensidad de las alteraciones es mayor en el cultivo celular procedente de ratas adultas.

3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno en cultivo primario de hepatocitos de ratas jóvenes y adultas incubados en presencia de ciclosporina A

Para investigar la causa de las diferencias en la intensidad del efecto citotóxico de la ciclosporina A puestas de manifiesto al medir la liberación de enzimas citosólicos

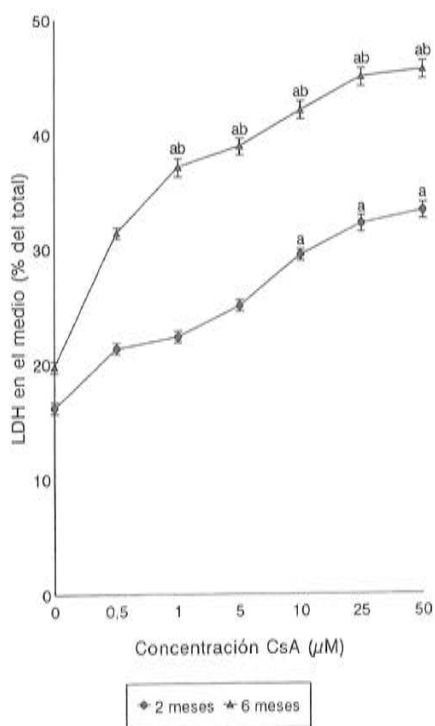
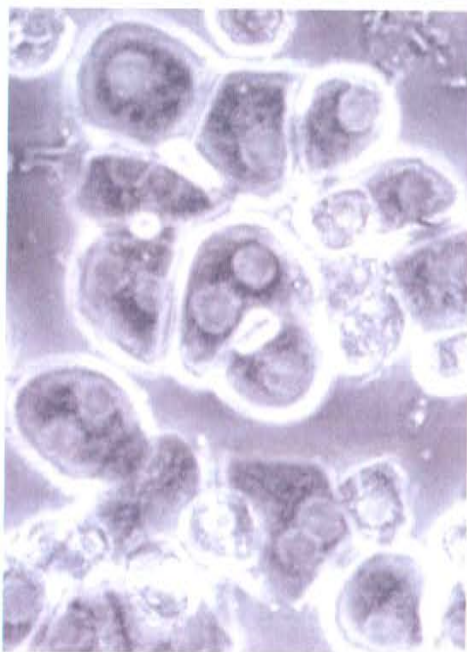


FIGURA 1. Efectos citotóxicos de la ciclosporina A en hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses. Los hepatocitos en cultivo primario se incubaron con concentraciones crecientes de CsA durante 24 horas. Después del tratamiento, la citotoxicidad se evaluó midiendo el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Los resultados son media de tres placas procedentes de tres animales distintos. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

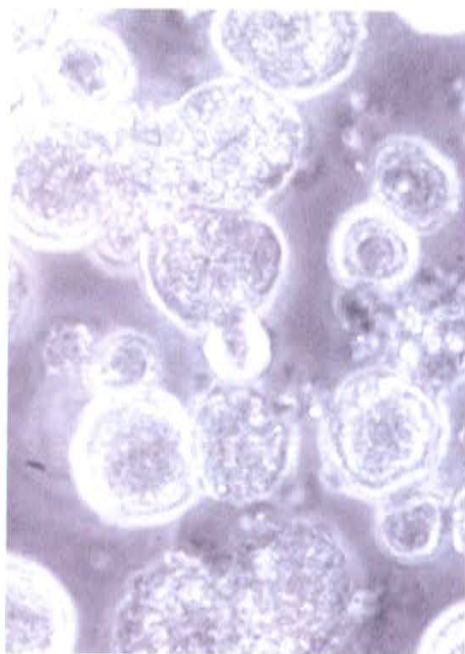
al medio, se procedió a evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno por las células al ser este uno de los mecanismos desencadenantes de la hepatotoxicidad del fármaco. La generación de estas especies se determinó por técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal. Las especies reactivas de oxígeno, anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, pueden ser generadas por diversas vías durante el metabolismo de numerosos xenobióticos. Tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 presentan una reactividad muy limitada, de modo que su importancia reside en la posibilidad de producir el $\cdot OH$, altamente reactivo, con la participación de metales de transición.

La producción de estas especies reactivas de oxígeno se valoró en los hepatocitos de ambas edades incubados durante 24 horas con concentraciones crecientes de CsA (0-50 μM). Para ello se utilizaron los fluorocromos hidroetidina (HET), específica para radical superóxido, y la 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA), altamente sensible en la detección del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos.

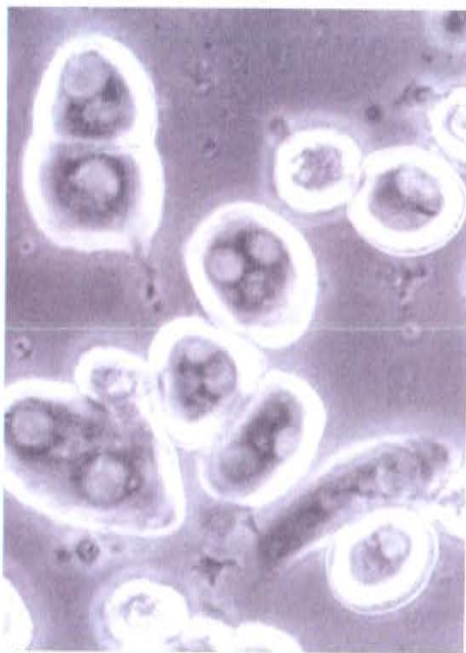
Para comprobar los resultados registrados citométricamente, se procedió a visualizar por imagen la producción de superóxido y peróxidos utilizando la microscopía confocal. Las aplicaciones de la microscopía confocal son las mismas que las de la



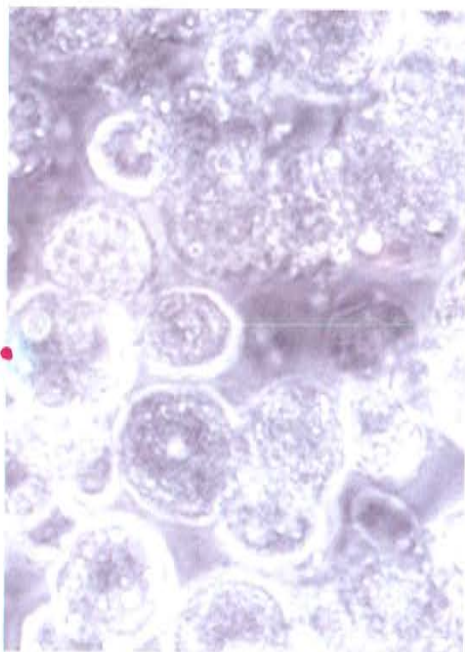
A



B



C



D

FIGURA 2. Alteración de la morfología celular inducida por la CsA en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Los hepatocitos control e incubados con una concentración 50 μM de CsA se observaron por microscopía. (A) Control 2 meses; (B) CsA 50 μM 2 meses; (C) Control 6 meses; (D) CsA 50 μM 6 meses.

microscopía de fluorescencia, la de campo claro o la de contraste de fases, con la ventaja del aumento de resolución y la capacidad de incrementar los contrastes sin disminuir dicha resolución. Se siguió el procedimiento que se detalla en el capítulo de Material y Métodos, escaneando las células una sola vez con el láser, ya que la DCFH es tan sensible a la oxidación que la exposición más continuada a la luz láser puede inducir fotooxidación, dando como resultado una fluorescencia incrementada (Mattson *et al*, 1995).

3.2.1. Niveles de peróxido de hidrógeno

La DCFH-DA es un compuesto que una vez incorporado a las células sufre un proceso de desacetilación por esterasas intracelulares y posteriormente es oxidado por peróxidos celulares para generar el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCF). La intensidad de fluorescencia de la DCF es un índice de la cantidad de peróxidos (H_2O_2 y peróxidos de bajo peso molecular) en el interior de las células.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo, en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses, se muestran en las Figuras 3 y 4 respectivamente, donde se pueden observar los histogramas de un experimento representativo en los que se representa en abcisas la intensidad relativa de fluorescencia emitida por la diclorofluorescina frente al número de células en ordenadas. La Tabla 2 recoge el análisis cuantitativo de los mismos experimentos. La cuantificación muestra, tanto en hepatocitos de ratas jóvenes como de adultas, que la producción global de peróxidos aumenta significativamente a concentraciones bajas y medias (de 0,5 a 10 μM), y disminuye a dosis elevadas (25 y 50 μM). Sin embargo, atendiendo únicamente a los valores de intensidad de fluorescencia de células DCF positivas, se observa, en hepatocitos de ambas edades, como la producción de peróxidos aumenta de forma paralela a la concentración de CsA. Aunque el perfil descrito para ambas edades es similar, existen diferencias en la producción global de peróxidos respecto a la edad, ya que en hepatocitos de rata de 2 meses aumenta más intensamente a bajas concentraciones (0,5 y 1 μM) para disminuir a partir de 5 μM , mientras que el aumento es progresivo y sostenido hasta concentraciones de 10 μM para disminuir, a las concentraciones más elevadas de CsA (25 y 50 μM). Los cambios registrados fueron más marcados en ratas de 6 meses.

En las Figuras 5 y 6 se muestran las fotografías obtenidas por microscopía confocal al incubar con diclorofluorescina diacetato y yoduro de propidio durante 30 minutos, las células de ratas de 2 y 6 meses previamente incubadas con CsA durante 24 horas. Las fotografías A, B, C y D corresponden a concentraciones de CsA de 0, 5, 25 y 50 μM respectivamente. En principio podemos apreciar, por la señal correspondiente al yoduro de propidio, que las células de los cultivos, tanto de ratas de 2 como de 6 meses, tratados con las concentraciones más altas de ciclosporina A, principalmente 25 y 50 μM , aparecen teñidas con más intensidad (fluorescencia roja), indicando que en estas condiciones aparece una mayor proporción de células muertas frente a los controles sin CsA y frente a células tratadas con dosis menores de la droga.

Comparando las figuras relativas a las dos edades ensayadas (2 y 6 meses) se aprecia que la proporción de células muertas a elevadas concentraciones de CsA, es mayor en cultivos de rata adultas. Por otra parte, la señal correspondiente a la diclorofluorescina (fluorescencia verde) nos indica que en ambas edades la presencia de

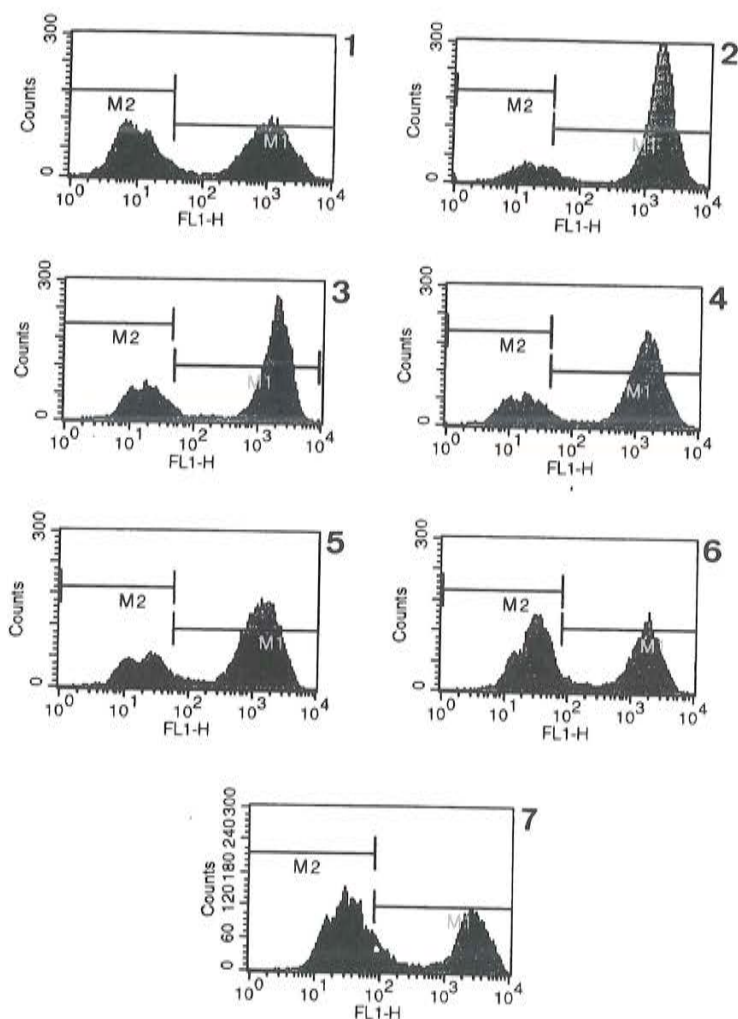


FIGURA 3. Análisis citométrico de los niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 2 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con DCFH-DA durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50 μM de CsA.

peróxidos en las células es más abundante a medida que se incrementa la concentración del fármaco. Sin embargo, a las concentraciones más elevadas de CsA (25 y 50 μM) la señal global de la DCF disminuye coincidiendo con el aumento de la señal de yoduro de propidio, lo que indica un aumento de la relación de células muertas (concentraciones tóxicas de la droga). En estas últimas, los hepatocitos muestran una intensidad de fluorescencia más baja, indicando que la producción global de peróxidos es menor, dato corroborado por citometría de flujo. Sin embargo, algunas células aparecen fuertemente teñidas con el fluorocromo que son las detectadas por citometría como DCF positivas de elevada intensidad de emisión (2098,6 \pm 200,8 y 2149,6 \pm 158,9 para hepatocitos de rata de 2 y 6 meses respectivamente).

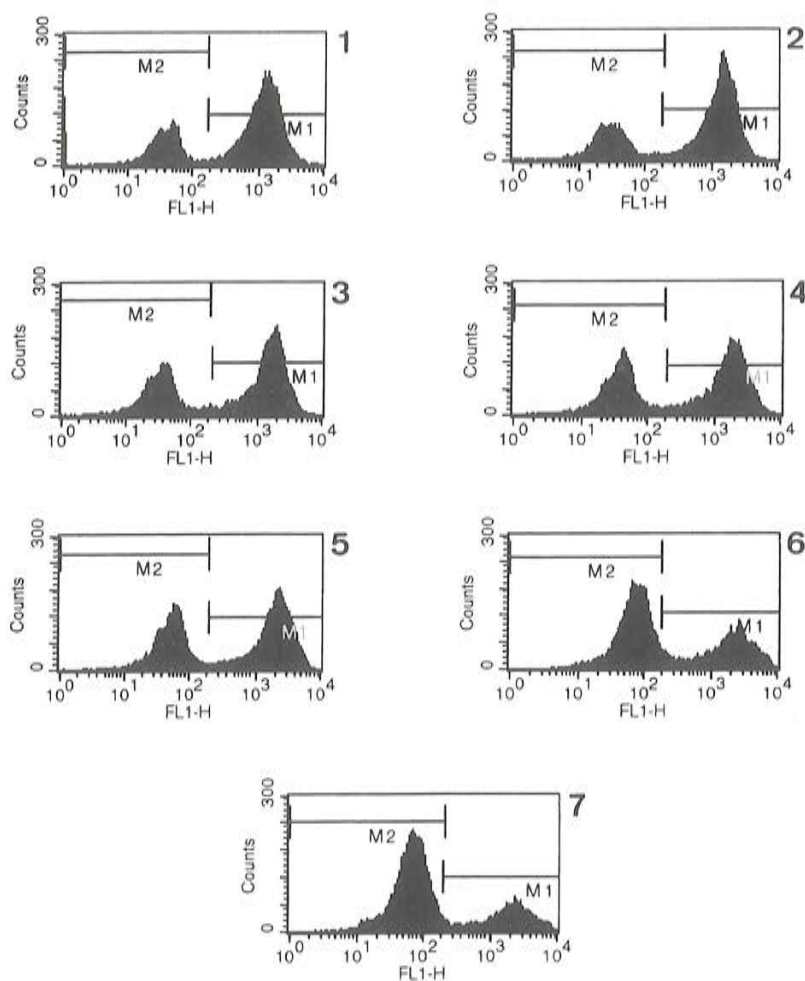


FIGURA 4. Análisis citométrico de los niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 6 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con DCFH-DA durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50 μM de CsA.

3.2.2. Niveles de radical superóxido

La hidroetidina es un derivado hidrogenado del etidio capaz de atravesar la membrana de células vivas y que presenta fluorescencia azul en el citoplasma. Esta fluorescencia azul pasa a roja cuando el fluorocromo se intercala en el DNA tras sufrir una deshidrogenación ocasionada por el radical superóxido.

En la Figuras 7 y 8 se muestran los histogramas de un experimento representativo, correspondientes a cultivos de hepatocitos de ratas jóvenes y adultas, obtenidos por citometría de flujo. La Tabla 3 recoge el análisis cuantitativo de los mismos experi-

Concentración de CsA (μM)	Intensidad media células DCF (+)		Intensidad media global	
	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
0	1182,9 \pm 123,3	1258,3 \pm 146,3	638,2 \pm 59,2	884,2 \pm 95,2 ^b
0,5	1580,3 \pm 143,3 ^a	1396,7 \pm 102,0	1262,2 \pm 133,4 ^a	976,6 \pm 114,8 ^b
1	1780,2 \pm 166,8 ^a	1568,8 \pm 93,1	1263,8 \pm 125,8 ^a	978,5 \pm 124,7 ^b
5	1620,0 \pm 173,8 ^a	1730,6 \pm 137,8 ^a	1182,1 \pm 102,1 ^a	1028,8 \pm 98,1 ^a
10	1515,8 \pm 158,4 ^a	2054,7 \pm 153,1 ^{ab}	1122,2 \pm 95,0 ^a	1220,8 \pm 102,3 ^a
25	1680,3 \pm 181,4 ^a	2151,8 \pm 162,2 ^{ab}	935,3 \pm 100,8	852,2 \pm 71,0
50	2098,6 \pm 200,8 ^a	2149,6 \pm 158,9 ^a	920,6 \pm 105,8	644,2 \pm 82,2 ^{ab}

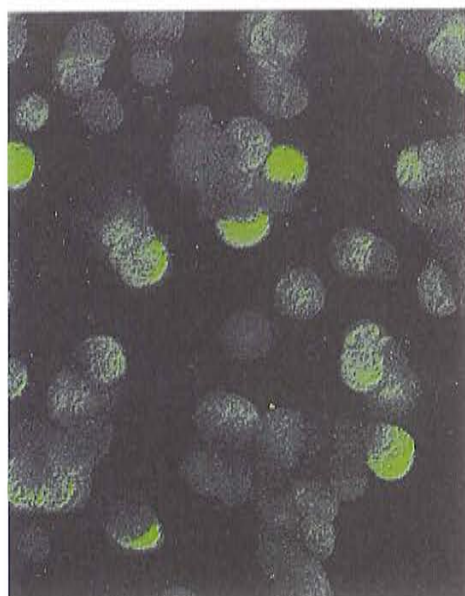
TABLA 2. Análisis citométrico de los niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Intensidad relativa de fluorescencia de la DCF como medida de la producción de peróxidos por las células tratadas con las diferentes dosis de CsA. Los resultados son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

mentos. En las dos edades ensayadas se observa, que tanto la producción global de radical superóxido como sus niveles en células HET positivas van disminuyendo a medida que aumenta la concentración de ciclosporina A, siendo significativa esta disminución a partir de 5 μM en cultivos de hepatocitos de rata de 6 meses, y a partir de 25 μM en los de 2 meses.

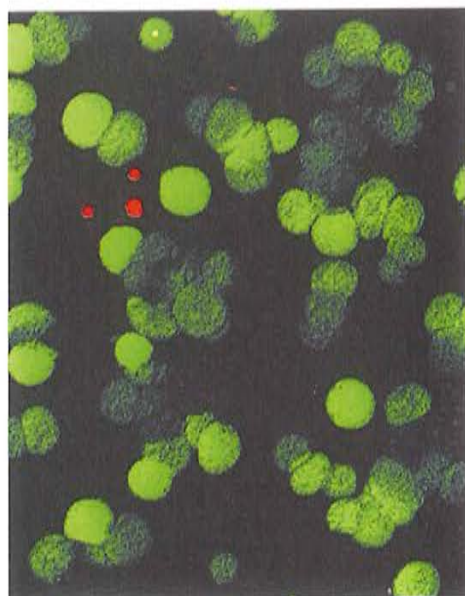
Las Figuras 9 y 10 muestran las fotografías obtenidas por microscopía confocal tras un proceso de incubación con HET durante 30 minutos de los cultivos previamente incubados durante 24 horas con CsA. Las fotografías A, B, C y D se corresponden con las concentraciones de 0, 5, 25 y 50 μM de ciclosporina A, respectivamente. En los cultivos de ambas edades, se aprecia que la señal correspondiente al HET oxidado (fluorescencia roja) va perdiendo intensidad con el aumento de la concentración del fármaco, para llegar a un mínimo de emisión a 50 μM coincidiendo con la mayor proporción de células muertas (células de tonalidad oscura-negra).

3.3. Estudio de los sistemas de defensa antioxidante en la citotoxicidad de la ciclosporina A durante el desarrollo

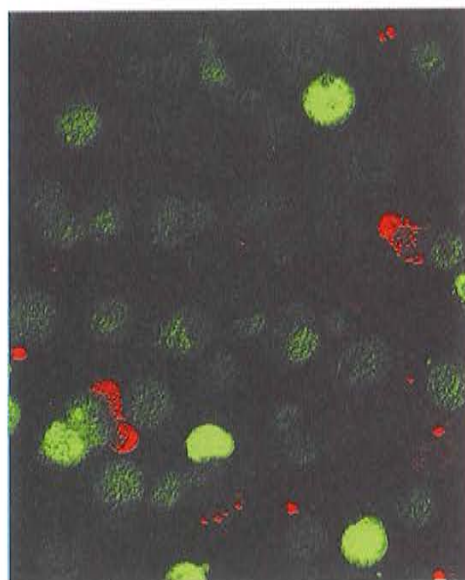
Después de comprobar que la generación de especies reactivas de oxígeno en los cultivos de hepatocitos de animales de 6 meses tratados con ciclosporina A es superior a la de 2 meses, y para profundizar en la relación de la hepatotoxicidad de la droga con dicha producción, se procedió a determinar los cambios sufridos en la expresión y actividad de los mensajeros de enzimas implicados en la respuesta de la célula frente al estrés oxidativo. En este trabajo se registran las variaciones observadas en los enzimas superóxido dismutasa (CuZn-SOD y Mn-SOD) y catalasa. Todos ellos protegen a las células de los efectos lesivos de las especies reactivas de oxígeno, la SOD eliminando al radical O_2^- y la catalasa haciendo disminuir los niveles de H_2O_2 .



A



B

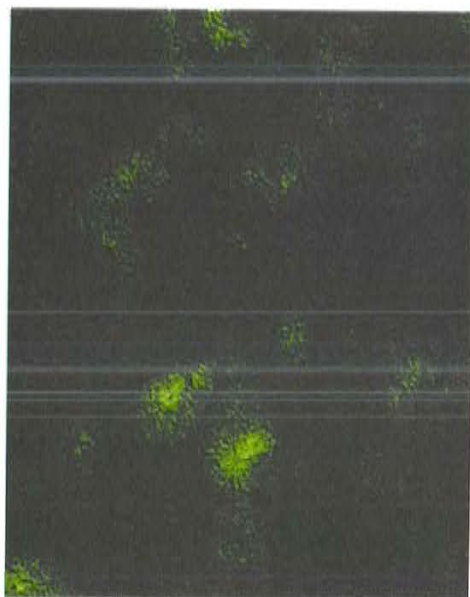


C

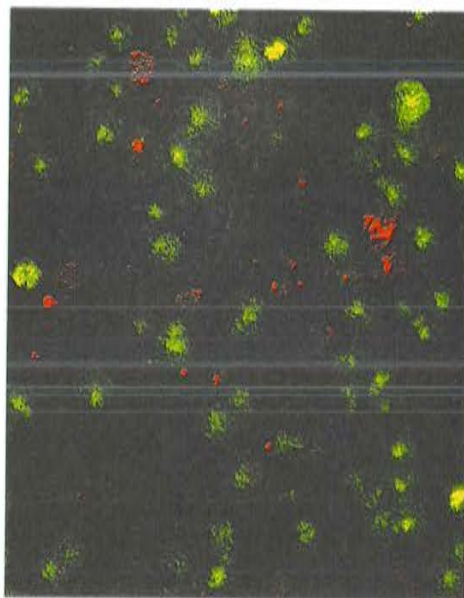


D

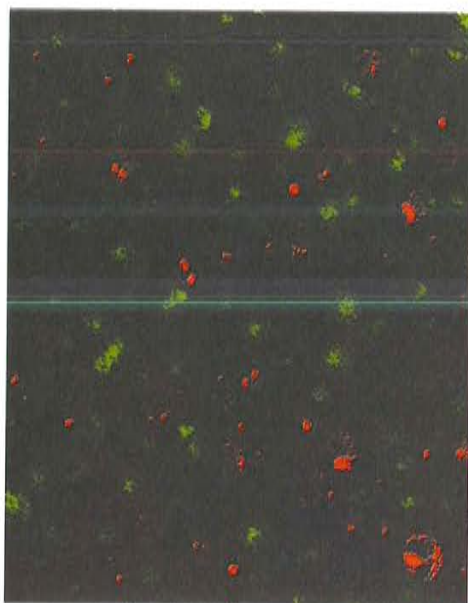
FIGURA 5. Niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 2 meses analizados por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50 μM de ciclosporina A.



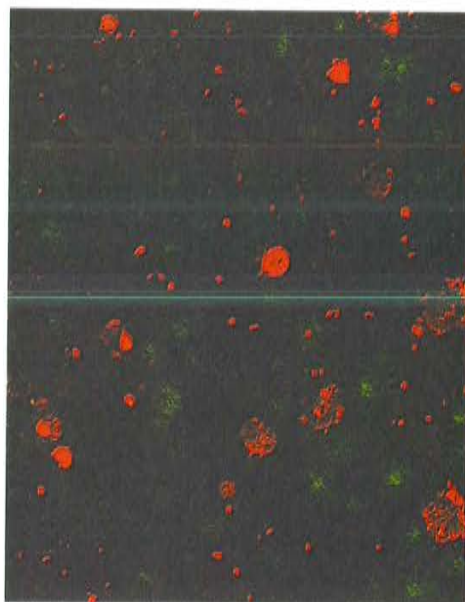
A



B



C



D

FIGURA 6. Niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 6 meses analizados por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50 μM de ciclosporina A.

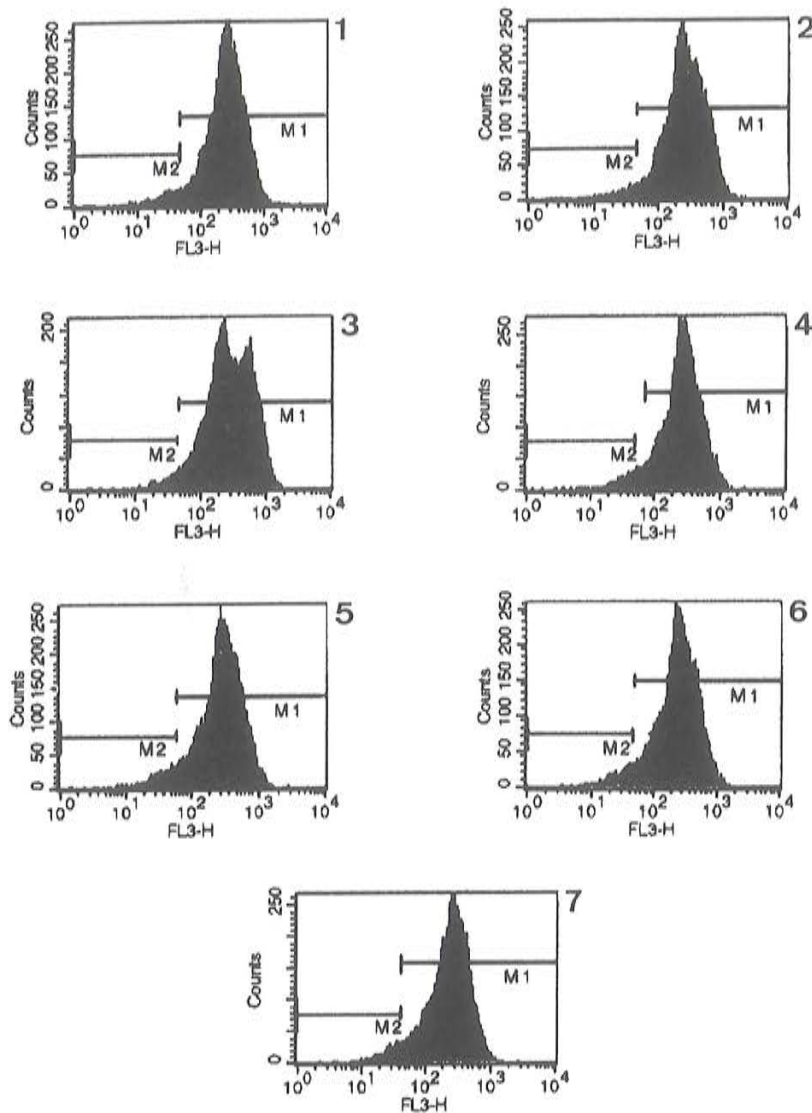


FIGURA 7. Análisis citométrico de los niveles de superóxido en hepatocitos de rata de 2 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con HEt durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50 μM de CsA.

3.3.1. Expresión génica de la Mn-SOD y la CuZn-SOD

La SOD es una familia de metaloenzimas con diferentes grupos prostéticos que actúan protegiendo a la célula del radical superóxido, ya que catalizan su transformación para dar H_2O_2 y O_2 . En este trabajo se ha determinado la expresión de las dos isoenzimas, la Mn-SOD y la CuZn-SOD.

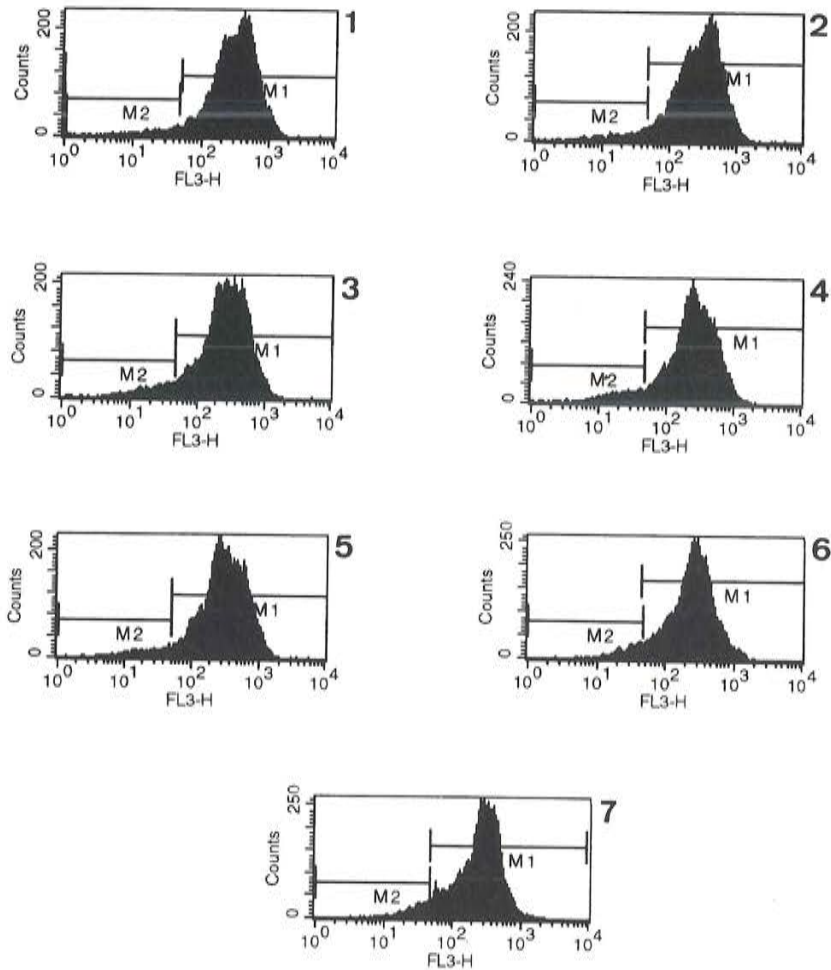


FIGURA 8. Análisis citométrico de los niveles de superóxido en hepatocitos de rata de 6 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con HET durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50 μ M de CsA.

La Figura 11 muestra el análisis por Northern blot y la cuantificación por densitometría, de la expresión de la Mn-SOD en cultivos primarios de hepatocitos de rata de 2 y 6 meses expuestos a dosis crecientes de CsA desde 0 a 50 μ M durante 24 horas.

En los cultivos de hepatocitos de rata de 2 meses, podemos observar que los niveles de mRNA de la Mn-SOD experimentan un aumento significativo a partir de la concentración de 5 μ M, llegando a incrementarse hasta un 270% a la concentración de 50 μ M. Por otra parte, en los cultivos de hepatocitos de rata adulta, la incubación con ciclosporina provocó modificaciones en los niveles del mensajero de la Mn-SOD teniendo lugar un aumento significativo a concentraciones elevadas del fármaco (25 y 50 μ M). Comparando los niveles del transcrito de Mn-SOD en las dos edades, se observa como éstos son siempre más elevados en ratas adultas alcanzando diferencias

Concentración de CsA (μM)	Intensidad media células HET (+)		Intensidad media global	
	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
0	315,1 \pm 33,2	369,4 \pm 35,2 ^b	302,7 \pm 28,6	351,4 \pm 41,1
0,5	311,8 \pm 28,6	340,9 \pm 42,9	300,3 \pm 23,7	323,5 \pm 35,3
1	324,5 \pm 28,8	316,2 \pm 43,5	312,6 \pm 36,2	296,4 \pm 34,0
5	301,7 \pm 37,2	304,4 \pm 33,8 ^a	287,8 \pm 26,7	282,8 \pm 36,8 ^a
10	295,1 \pm 26,3	308,3 \pm 31,7 ^a	275,5 \pm 30,1 ^a	291,4 \pm 34,7 ^a
25	283,5 \pm 30,0 ^a	289,8 \pm 34,9 ^a	266,3 \pm 27,2 ^a	273,4 \pm 32,9 ^a
50	266,8 \pm 24,8 ^a	291,5 \pm 30,2 ^a	253,2 \pm 31,3 ^a	274,9 \pm 38,0 ^a

TABLA 3. Análisis citométrico de los niveles de superóxido en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Intensidad relativa de fluorescencia del etidio como medida de la producción de superóxido por las células tratadas con las diferentes dosis de CsA. Los resultados son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

significativas en varios puntos (control, 1, 5, 10, 25, 50 μM), sin embargo si comparamos la magnitud de los incrementos en ambas edades, vemos como ésta es mayor en hepatocitos de rata joven, alcanzando un incremento de un 270% frente al 217% de hepatocitos de rata adulta.

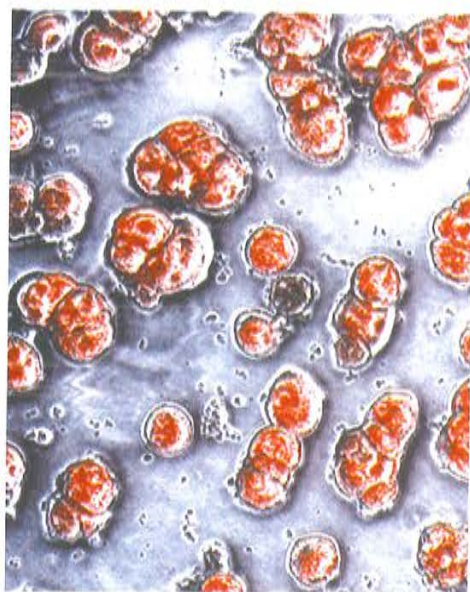
La Figura 12 muestra el análisis por Northern blot y la cuantificación por densitometría, de la expresión de la CuZn-SOD en cultivos primarios de hepatocitos de ratas jóvenes y adultas incubados con CsA durante 24 horas.

Por los datos obtenidos por densitometría, podemos observar que tanto en los cultivos procedentes de ratas jóvenes como adultas, la expresión de la CuZn-SOD aumenta paralelamente con la dosis de CsA, para alcanzar valores significativos a partir de concentraciones de 50 y 25 μM para hepatocitos de rata de 2 y 6 meses respectivamente. Al igual que en la Mn-SOD, los niveles del mensajero de CuZn-SOD fueron mayores, en todas las condiciones del cultivo, en hepatocitos de rata adulta, siendo significativa la diferencia en todas las concentraciones. Sin embargo, la magnitud del incremento volvió a ser superior en hepatocitos de rata joven (279%) frente a los de rata adulta (203%).

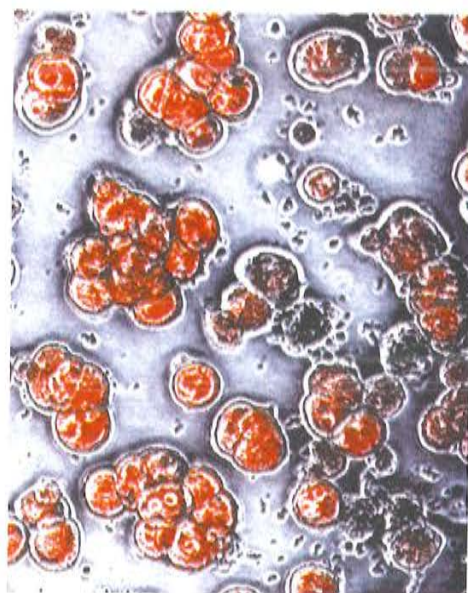
3.3.2. Expresión génica de la catalasa

La catalasa es el enzima encargado de eliminar el H_2O_2 de la célula para producir H_2O y O_2 . Tras exponer los cultivos de hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses a concentraciones de ciclosporina A de 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50 μM , se procedió a realizar el análisis por Northern blot de los niveles del transcrito del mismo enzima. Tanto el Northern blot como su cuantificación densitométrica se muestran en la Figura 13.

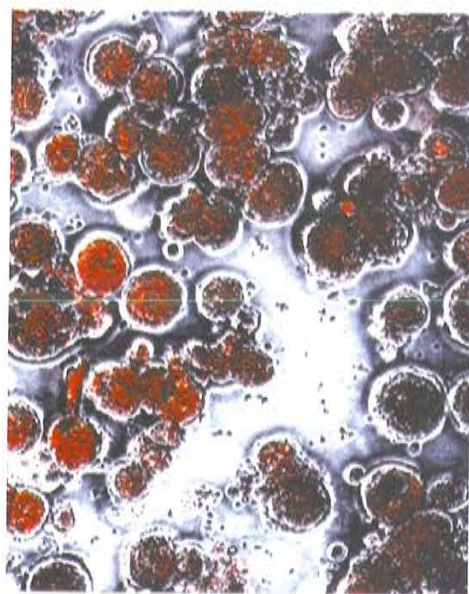
Podemos observar, como la incubación de las células parenquimales hepáticas con concentraciones crecientes de CsA provoca, tanto en cultivos de ratas jóvenes como de adultas, un incremento en la expresión de la catalasa, pero mientras que en hepatocitos



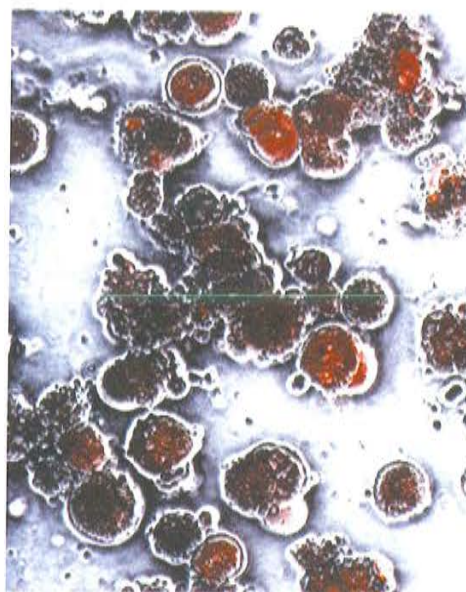
A



B

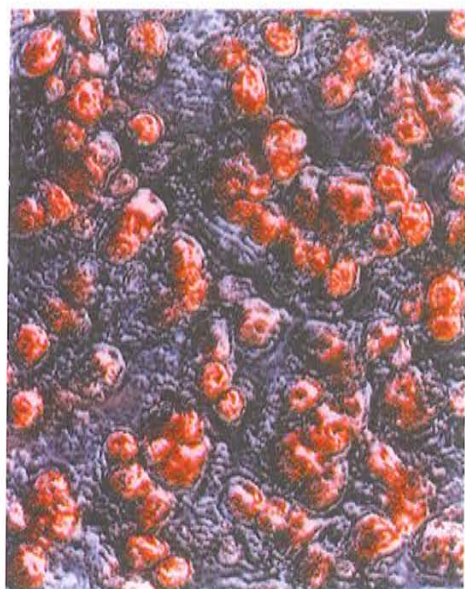


C



D

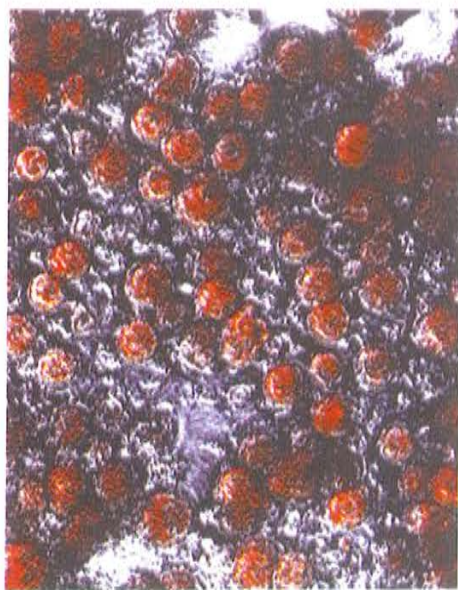
FIGURA 9. Niveles de radical superóxido en hepatocitos de rata de 2 meses analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con H₂O₂ durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50 μ M de ciclosporina.



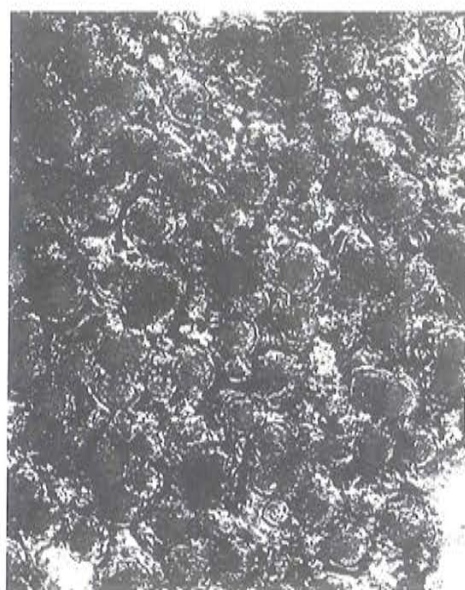
A



B



C



D

FIGURA 10. Niveles de radical superóxido en hepatocitos de rata de 6 meses analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con HET durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50 μM de ciclosporina.

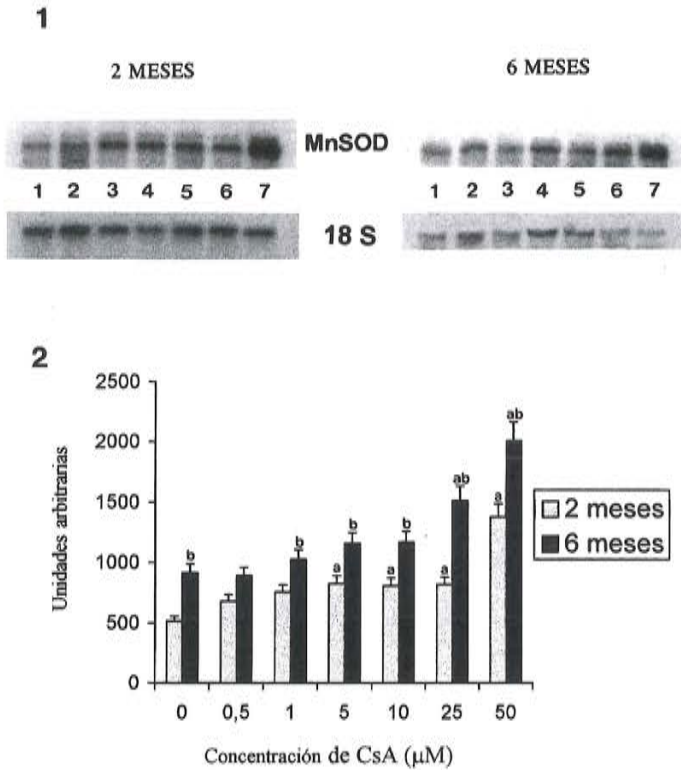


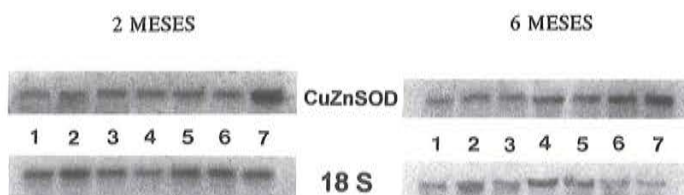
FIGURA 11. Análisis por Northern blot del mRNA de la Mn-SOD en hepatocitos de rata tratados con concentraciones crecientes de CsA. El Panel 1 muestra un Northern blot representativo de tres experimentos realizados en cultivos porcedentes de tres animales distintos. 20 μ g de RNA total se hibridaron con el cDNA de la Mn-SOD marcado con α - 32 P utilizando como sonda de normalización el rRNA 18S. (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50 μ M, respectivamente). El Panel 2 muestra el análisis cuantitativo de dichos mRNAs mensajeros. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

de rata adulta este aumento no fue significativo en ninguna concentración, en hepatocitos de rata joven la diferencia respecto al control fue significativa a 50 μ M de CsA. Los niveles de mensajero fueron siempre mayores en hepatocitos de rata de 6 meses, pero no llegando a ser significativa la diferencia en ningún caso. Al igual que ocurre en las otras dos enzimas antioxidantes estudiadas, la magnitud del incremento fue mayor en ratas jóvenes (160%) que en ratas adultas (130%).

3.4. Análisis del ciclo celular en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses tratados con CsA

Debido a que durante el desarrollo se produce una modificación en la distribución de las poblaciones de hepatocitos comprometidas en las distintas fases del ciclo celular (102) estudiamos si el efecto citotóxico de la CsA influía sobre estas variaciones.

1



2

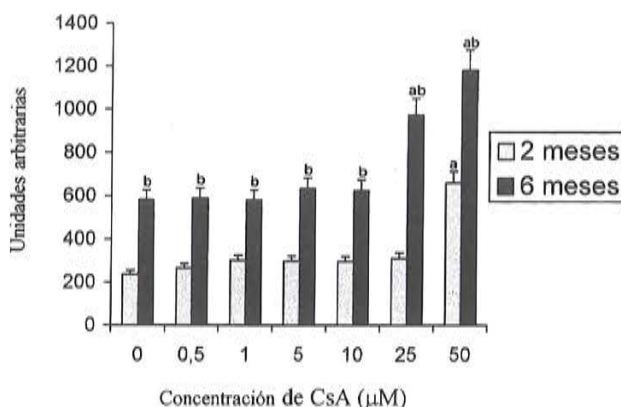


FIGURA 12. Análisis por Northern blot del mRNA de la CuZn-SOD en hepatocitos de rata tratados con concentraciones crecientes de CsA. El Panel 1 muestra un Northern blot representativo de tres experimentos realizados en cultivos porcedentes de tres animales distintos. 20 μg de RNA total se hibridaron con el cDNA de la CuZn-SOD marcado con $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ utilizando como sonda de normalización el rRNA 18S. (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50 μM , respectivamente). El Panel 2 muestra el análisis cuantitativo de dichos mRNAs mensajeros. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

3.4.1. Análisis del contenido del DNA genómico por citometría de flujo

Las muestras de cultivos de hepatocitos de ratas de 2 y 6 meses incubados durante 24 horas con diferentes concentraciones de CsA, se procesaron y analizaron en base a su contenido en DNA. En las Figuras 14 y 15 se muestran los histogramas donde se representa el contenido de DNA en abscisas, evaluado por la fluorescencia del yoduro de propidio, frente al número de células en ordenadas, procedentes de animales de 2 y 6 meses, respectivamente. El análisis cuantitativo de cada histograma se muestra en la Tabla 4, donde se muestra el porcentaje de las poblaciones diploides (2C), tetraploides (4C), octoploides (8C), S_1 y S_2 .

Coincidiendo con resultados previos de nuestro grupo (103), los cultivos de hepatocitos control muestran durante el desarrollo (de 2 a 6 meses) una tendencia hacia la poliploidización, caracterizada por un descenso a un 45% de los hepatocitos con con-

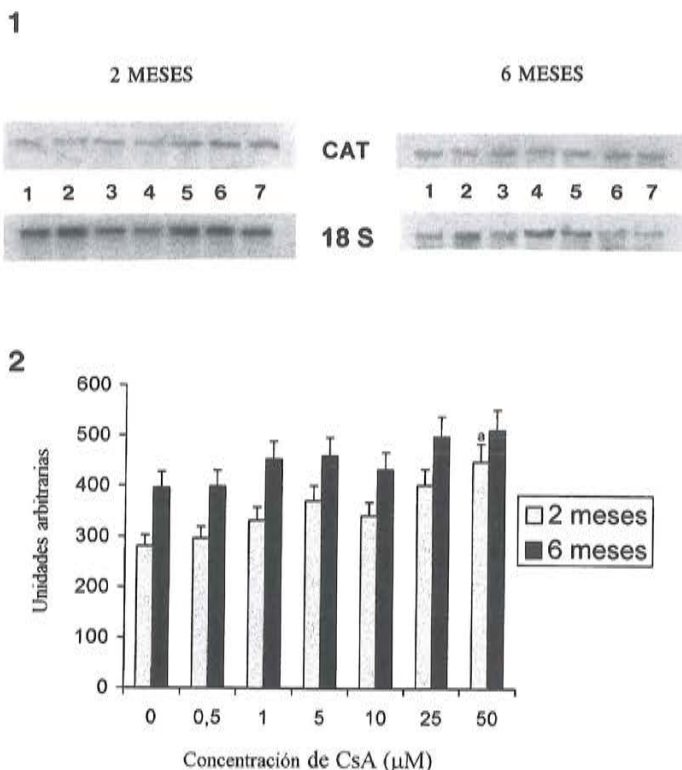


FIGURA 13. Análisis por Northern blot del mRNA de la catalasa en hepatocitos de rata tratados con concentraciones crecientes de CsA. El Panel 1 muestra un Northern blot representativo de tres experimentos realizados en cultivos porcedentes de tres animales distintos. 20 μg de RNA total se hibridaron con el cDNA de la catalasa marcado con α - 32 P utilizando como sonda de normalización el rRNA 18S. (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50 μM, respectivamente). El Panel 2 muestra el análisis cuantitativo de dichos mRNAs mensajeros. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

tenido diploide (de un $48,0 \pm 5,1$ a un $21,7 \pm 2,6$; $p < 0,005$) a favor de un incremento de los hepatocitos con contenido tetraploide (127%) y octoploide (1050%) (de $46,2 \pm 3,8$ a un $58,7 \pm 4,6$ y de $0,6 \pm 0,09$ a $6,3 \pm 0,7$, respectivamente). Cabe destacar el incremento significativo (616%) que se verifica en la apoptosis en muestras de 6 meses frente a las de 2 meses ($7,4 \pm 0,8$ versus $1,2 \pm 0,2$ $p < 0,005$).

Respecto a los cultivos tratados con CsA, los datos muestran que al aumentar la concentración del fármaco se produce un descenso de la proporción de hepatocitos con dotación diploide con un paralelo incremento de las células tetraploides. Estas modificaciones, aunque se producen tanto en células de animales jóvenes como en las de los adultos, son más acusadas en estos últimos (reducción a un 38% en células 2C e incremento a un 131% en 4C en hepatocitos de rata de 6 meses, frente a la reducción a un 86% en 2C e incremento a un 108% en 4C para hepatocitos de rata de 2 meses), siendo además significativo, respecto al control, tanto el descenso de células 2C desde

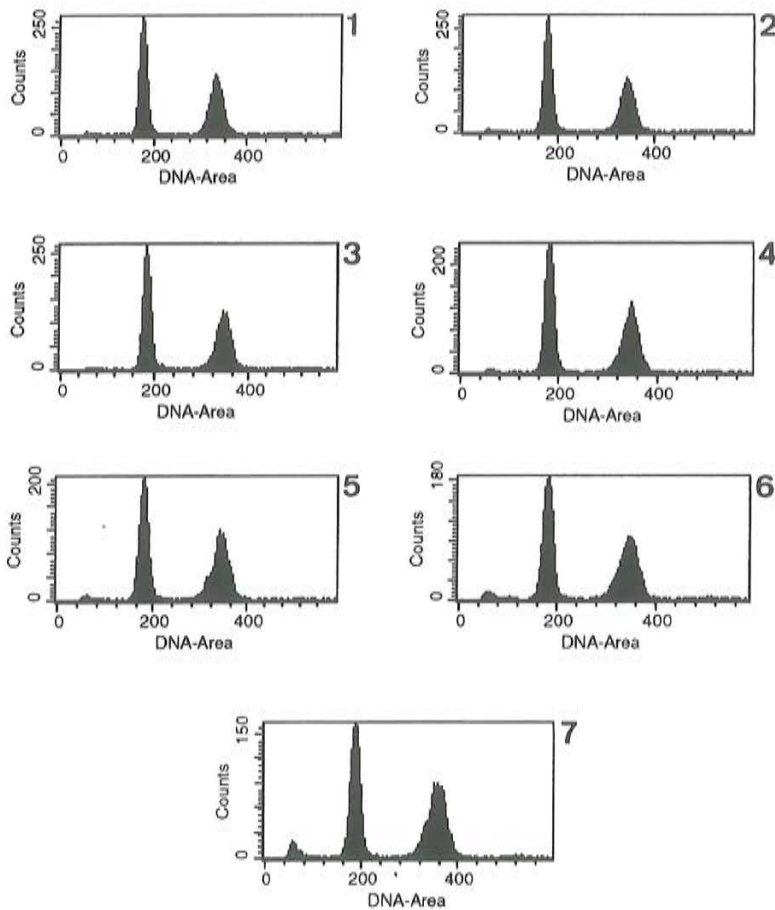


FIGURA 14. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo en hepatocitos de rata de 2 meses. Las células tratadas con CsA se tripsinizaron y trataron según las indicaciones del kit kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Se muestran los histogramas de un experimento representativo correspondientes a las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50 μM de CsA.

concentraciones de 10 μM como el incremento de 4C desde 5 μM para los hepatocitos de ratas adultas, mientras que en los de ratas jóvenes, ni el descenso ni el incremento, fue significativo a ninguna concentración. Por otra parte, se observa en todas las concentraciones, como la proporción de células 2C es significativamente menor, así como la proporción de células 4C es significativamente mayor, en hepatocitos de ratas adultas respecto a las jóvenes.

La cuantificación del pico hipodiploide, reveló que a bajas dosis de CsA (hasta 1 μM), se producía un descenso del porcentaje de células con dotación <2C, tanto en hepatocitos de ratas jóvenes como adultas, pero con la diferencia de que el descenso sólo fue significativo en estos últimos (de $7,4 \pm 0,8$ a $0,9 \pm 0,1$). A partir de la concentración de 1 μM , se verificó un aumento de la proporción de células <2C en ambas edades, llegando a un $4,3 \pm 0,5$ y a un $6,5 \pm 0,5$, a la concentración de 50 μM , en

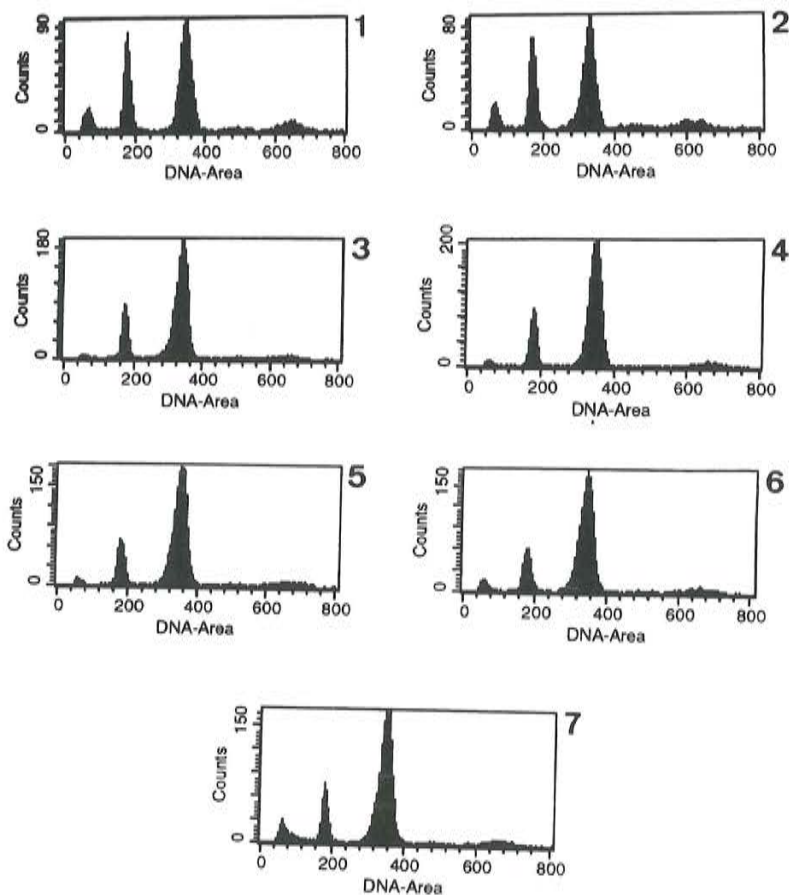


FIGURA 15. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo en hepatocitos de rata de 6 meses. Las células tratadas con CsA se tripsinizaron y trataron según las indicaciones del kit kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Se muestran los histogramas de un experimento representativo correspondientes a las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50 μM de CsA.

hepatocitos de rata de 2 y 6 meses respectivamente. Hay que destacar, que aunque el incremento de células $<2C$ desde la concentración de 1 μM fue mayor en hepatocitos de ratas de 6 meses (de $0,9 \pm 0,1$ a $6,5 \pm 0,5$) que en los de rata de 2 meses (de $0,7 \pm 0,1$ a $4,3 \pm 0,5$), en estos últimos, el valor de $4,3 \pm 0,5$ fue muy superior al valor del control ($1,2 \pm 0,2$), hecho que no ocurre en hepatocitos de ratas adultas ($6,5 \pm 0,5$ a 50 μM frente a $7,4 \pm 0,8$ del control).

Atendiendo a los valores de células comprometidas en fase de síntesis S_1 , no se produjeron diferencias significativas respecto al control en ninguna de las dos edades, ni tampoco respecto a la edad. Sin embargo, en la fase S_2 , en los cultivos de hepatocitos de rata de 6 meses, se observó un significativo descenso respecto al control a partir de la concentración 1 μM . Además, en esta fase S_2 , aparecieron diferencias significativas respecto a la edad en los controles y en los cultivos tratados con 0,5 μM de CsA.

A

CsA (μ M)	2 meses					
	< 2C	2C	S ₁	4C	S ₂	8C
0	1,2 \pm 0,2	48,0 \pm 5,1	2,6 \pm 0,2	46,2 \pm 3,8	1,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,09
0,5	0,9 \pm 0,1	48,7 \pm 4,7	2,6 \pm 0,4	46,0 \pm 5,0	1,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,06
1	0,7 \pm 0,1	46,8 \pm 4,8	2,3 \pm 0,3	48,3 \pm 5,8	1,4 \pm 0,3	0,5 \pm 0,08
5	1,0 \pm 0,2	46,0 \pm 5,7	2,1 \pm 0,2	49,1 \pm 3,3	1,3 \pm 0,1	0,5 \pm 0,05
10	1,1 \pm 0,2	45,9 \pm 5,8	2,5 \pm 0,3	49,0 \pm 4,2	1,0 \pm 0,3	0,7 \pm 0,11
25	2,7 \pm 0,3 ^a	43,7 \pm 3,7	2,6 \pm 0,4	49,0 \pm 4,3	1,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,07
50	4,3 \pm 0,5 ^a	41,5 \pm 5,9	2,3 \pm 0,5	50,0 \pm 3,9	1,1 \pm 0,2	0,8 \pm 0,13

B

CsA (μ M)	6 meses					
	< 2C	2C	S ₁	4C	S ₂	8C
0	7,4 \pm 0,8 ^b	21,7 \pm 2,6 ^b	2,1 \pm 0,2	58,7 \pm 4,6 ^b	3,8 \pm 0,4 ^b	6,3 \pm 0,7 ^b
0,5	6,5 \pm 0,5 ^b	22,5 \pm 1,9 ^b	1,8 \pm 0,2	59,7 \pm 6,0 ^b	4,0 \pm 0,9 ^b	5,5 \pm 0,3 ^b
1	0,9 \pm 0,1 ^a	15,1 \pm 1,4 ^b	1,9 \pm 0,3	74,5 \pm 7,8 ^b	2,4 \pm 0,3 ^a	4,0 \pm 0,4 ^b
5	1,1 \pm 0,3 ^a	14,9 \pm 0,7 ^b	2,0 \pm 0,2	76,7 \pm 6,4 ^{ab}	1,4 \pm 0,2 ^a	3,9 \pm 0,2 ^b
10	1,1 \pm 0,2 ^a	13,2 \pm 1,6 ^{ab}	1,8 \pm 0,2	78,1 \pm 6,5 ^{ab}	1,6 \pm 0,2 ^a	4,2 \pm 0,5 ^b
25	3,1 \pm 0,6 ^a	12,6 \pm 1,5 ^{ab}	1,7 \pm 0,3	76,5 \pm 6,7 ^{ab}	1,4 \pm 0,3 ^a	4,7 \pm 0,6 ^b
50	6,5 \pm 0,5	8,2 \pm 1,0 ^{ab}	2,0 \pm 0,1	77,0 \pm 6,7 ^{ab}	1,8 \pm 0,3 ^a	4,5 \pm 0,3 ^b

TABLA 4. Porcentaje de distribución del DNA analizado por citometría de flujo. (A) Cuantificación de los histogramas mostrados en la Figura 14 (B) Cuantificación de los histogramas mostrados en la Figura 15. Los resultados son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

La fracción de células con dotación 8C, no sufrió variaciones significativas respecto al control en los cultivos de hepatocitos de rata de 2 ni de 6 meses, aunque en estos últimos se observó un ligero descenso. En todas las concentraciones, el porcentaje de células 8C fue significativamente mayor en cultivos de ratas adultas frente a ratas jóvenes.

CsA (μ M)	2 meses		6 meses	
	% 2C PCNA (-)	% apoptóticas PCNA (+)	% 2C PCNA (-)	% apoptóticas PCNA (+)
0	11,4 \pm 1,1	0,28 \pm 0,04	17,9 \pm 1,0 ^b	0,97 \pm 0,12 ^b
0,5	8,2 \pm 0,9 ^a	0,30 \pm 0,03	17,0 \pm 1,6 ^b	0,76 \pm 0,08 ^b
1	6,2 \pm 0,7 ^a	0,29 \pm 0,07	6,0 \pm 0,8 ^a	0,11 \pm 0,05 ^{ab}
5	5,2 \pm 0,8 ^a	0,73 \pm 0,08 ^a	5,3 \pm 0,5 ^a	0,76 \pm 0,09
10	5,5 \pm 0,6 ^a	1,09 \pm 0,12 ^a	4,2 \pm 0,4 ^a	0,86 \pm 0,14
25	3,4 \pm 0,3 ^a	1,70 \pm 0,13 ^a	3,1 \pm 0,2 ^a	1,76 \pm 0,18 ^a
50	3,0 \pm 0,3 ^a	2,81 \pm 0,31 ^a	2,2 \pm 0,2 ^a	4,87 \pm 0,51 ^{ab}

TABLA 5. Porcentaje de células analizadas por citometría de flujo con el kit Kinesis-PCNA en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia y son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos. $p < 0,005$ (^a diferencias significativas versus control; ^b diferencias significativas versus 2 meses).

3.4.2. Niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Los cambios observados en la ploidía y distribución del DNA nos llevaron a considerar que la CsA en cultivo primario de hepatocitos, inducía un descenso en la proporción de células con dotación diploide (2C) unido a un aumento paralelo de la fracción de células tetraploides (4C). Este perfil descrito, aparece en algunos procesos de proliferación, pero acompañado además de un aumento de la proporción de células en fases de síntesis. En nuestro caso, utilizando el método de tinción de DNA con yoduro de propidio, no se pudo detectar con claridad que la CsA provocara un aumento significativo de la fracción de hepatocitos en fase S₁, por ello y para esclarecer el efecto de la CsA decidimos estudiar los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El PCNA, como su nombre indica, es específico de células proliferantes, aunque no puede considerarse como marcador de la fase de síntesis del DNA, ya que su degradación no es inmediata después de que la célula supere la fase S, pudiéndose detectar en fase G₂ y M (2), así como en fase G₁, debido a que su expresión se produce al final de esta fase. A pesar de ello, el PCNA se considera en la actualidad uno de los mejores marcadores de proliferación celular (91).

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5 de Material y Métodos, se obtuvieron por citometría de flujo, los datos que aparecen en la Tabla 5. Según estos valores, se observa como la proporción de hepatocitos en estado quiescente, considerando ésta como células 2C PCNA negativas, disminuye significativamente en presencia de concentraciones bajas de CsA (0,5 y 1 µM) para quedar reducida a un 26% (de 11,4 ± 1,1 a un 3,0 ± 0,3 p<0,005) y a un 13% (de 17,9 ± 1,0 a un 2,2 ± 0,2 p<0,005) del valor inicial en ratas jóvenes y adultas respectivamente. En los controles y en presencia de CsA 0,5 µM aparecieron diferencias significativas dependientes de la edad, siendo mayor el porcentaje de células quiescentes en cultivos procedentes de rata de 6 meses que en los de 2 meses.

Respecto a la fracción de células apoptóticas PCNA positivas, se aprecia un significativo aumento de la misma en presencia de CsA. En hepatocitos de animal joven el ascenso de células apoptóticas PCNA positivas se registro a partir de concentraciones de CsA 5 µM, mientras que en los de animal adulto este ascenso se produjo en presencia de concentraciones más elevadas de CsA (25 y 50 µM). Al comparar estos resultados con los referentes a la hipodiploidía obtenido por citometría de flujo, se observa que a bajas concentraciones de CsA, el porcentaje de células apoptóticas PCNA positivas respecto al total de células hipodiploides es inferior que a elevadas concentraciones donde las células <2C PCNA positivas representan la mayoría de las apoptóticas:

	2 meses	6 meses
Control	23%	13%
50 µM	65%	74%

4. DISCUSION

En el campo clínico de los trasplantes la ciclosporina A se ha confirmado como el principal fármaco de elección para evitar rechazos debido a su potente acción inmunosupresora (60,111). No obstante, su uso clínico implica ciertas complicaciones como hipertensión, neuro, nefro y hepatotoxicidad (36,97). En el caso concreto de esta última, estudios previos han demostrado la participación de especies reactivas de oxígeno en su citotoxicidad (132,133), especies que por otra parte se incrementan progresivamente con la edad (103). Por ello, que el estudio de la toxicidad de la ciclosporina en cultivos primarios de hepatocitos frente a la edad (desarrollo y senescencia), sea de gran importancia farmacológica, ya que los pacientes potencialmente objeto de su uso se incluyen dentro de un intervalo de edad muy amplio.

4.1. Modificaciones en la citotoxicidad de la ciclosporina A *in vitro* debidas a la edad

En el presente trabajo, se ha investigado el efecto del desarrollo sobre la hepatotoxicidad de la ciclosporina A (CsA) utilizando un modelo *in vitro* de cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses de edad.

En primer lugar, con el fin de evaluar las modificaciones dependientes de la edad en el efecto tóxico de la ciclosporina A, se procedió a medir la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo, método por el que podemos registrar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y que, como se indicó en la introducción, es la principal característica que permite evaluar *in vitro* la muerte celular por necrosis. En los resultados obtenidos pudimos comprobar que la ciclosporina A ocasiona un daño letal en los hepatocitos en cultivo procedentes de ratas de ambas edades y que la toxicidad es dependiente de la edad, de la concentración de la droga y de la duración del tratamiento. El desarrollo de la muerte celular, evaluado por la liberación de LDH al medio, fue más temprano y más intenso en los cultivos de hepatocitos de ratas adultas. A las 18 horas de incubación tan sólo se encontraron diferencias significativas en los procedentes de animales adultos.

Para poder establecer comparaciones en la citotoxicidad del fármaco, se fijó en 24 horas el tiempo de incubación que fue en el que se detectaron variaciones significativas en hepatocitos de ambas edades. Al comparar los resultados de liberación de LDH entre ratas adultas y jóvenes, se observó que los valores fueron superiores, de una manera significativa, en el rango de concentraciones de CsA de 1-50 μM en las ratas de 6 meses frente a las de 2 meses. Estos resultados se corroboraron con las observaciones morfológicas, donde a la concentración de 50 μM de CsA la pérdida de integridad celular fue más acusada en los cultivos celulares procedentes de animales adultos.

4.2. Variaciones durante el desarrollo en la situación de estrés oxidativo inducida por ciclosporina A en cultivos de hepatocitos de rata

Estudios previos han demostrado, en diferentes órganos y sistemas celulares, que la CsA induce la generación de especies reactivas de oxígeno (131,132,88), así como

un proceso de peroxidación lipídica (52) acompañado de una disminución de tioles proteicos y de los niveles de glutatión reducido (132), todas ellas manifestaciones que conducen a una situación de estrés oxidativo (133). Por otra parte, estudios previos de nuestro grupo sobre hepatotoxicidad y senescencia (102), han demostrado la existencia de cambios a nivel de los sistemas de defensa antioxidante, en función de la edad, hecho que puede incrementar la toxicidad de aquellos xenobióticos cuyo mecanismo sea la generación de especies reactivas de oxígeno. La generación espontánea de estas especies en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (98) y su incompleta eliminación, pueden provocar su acumulación con el paso del tiempo (47), con el consiguiente incremento en el estado de oxidación celular (102). Es conocido también, que durante el metabolismo microsómico de la CsA, mediado por el citocromo P 450 3A (95), se generan especies reactivas de oxígeno. Esto unido al conocimiento de que la edad afecta a los sistemas microsómicos monooxigenasa de función mixta que dependen del citocromo P 450 (99), hace interesante el estudio conjunto de la lesión hepática inducida por hepatotóxicos y la edad en un doble aspecto: desarrollo y senescencia. En la presente memoria los resultados obtenidos en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses nos muestran las variaciones debidas al desarrollo, ya que aunque a los dos meses las ratas han adquirido su capacidad reproductora, el estado adulto no se alcanza hasta los 6 meses (102).

Por todo ello, y una vez establecido el potencial citotóxico de la CsA en cultivo primario de hepatocitos en ambas edades y que la edad adulta influyó en dicha toxicidad mostrándola anticipada y de mayor intensidad, el siguiente paso era estudiar las variaciones durante el desarrollo en la situación de estrés oxidativo inducida por el fármaco.

Para ello, y mediante el análisis por citometría de flujo, determinamos los niveles relativos de especies reactivas de oxígeno en células hepáticas utilizando los compuestos 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA) e hidroetidina (HET), que nos permiten diferenciar entre niveles de peróxidos y niveles de radical superóxido. El compuesto de DCFH-DA es apolar y atraviesa las membranas para hidrolizarse en el interior celular y dar la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH) cuya oxidación mediada por peróxidos lo convierte en 2',7'-diclorodihidrofluorescina que fluoresce en verde y es específica para la detección de peróxidos (37). Por otra parte, la HET también difunde a través de las membranas, y en el interior celular se oxida específicamente por el radical superóxido originando etidio, compuesto que se intercala en el DNA donde emite fluorescencia roja (100).

Así comprobamos que el tratamiento de las células con CsA durante 24 horas de incubación, provoca un aumento de los niveles de peróxidos de forma paralela al aumento de la concentración de CsA hasta 10 μM en ratas de 6 meses y hasta 1 μM en ratas de 2 meses, para posteriormente disminuir a partir de dichas concentraciones. En ratas de 6 meses este hecho coincide con el aumento de la emisión de yoduro de propidio a las concentraciones de 25 y 50 μM , indicativo de una mayor proporción de células muertas las cuales no poseen capacidad de emisión de diclorofluorescina. En hepatocitos de rata de 2 meses, el descenso en los niveles de peróxidos es menos marcado ya que la proporción de células que emiten fluorescencia roja (células muertas) es mucho menor que en 6 meses. Sin embargo, en esta edad, el inicio del descenso de los niveles de peróxidos se produce a concentraciones inferiores (a partir de 5 μM) donde todavía la muerte celular es baja, por lo que debe existir alguna otra causa que

provoque la reducción de los niveles de peróxidos, además del aumento de la muerte celular, como puede ser la eliminación de H_2O_2 por la catalasa, enzima antioxidante endógeno. Por otra parte, en ambas edades, existe una proporción de células cuyos niveles de peróxidos van aumentando paralelamente con el aumento de la concentración de CsA. Estas células posiblemente al no expresar de forma eficiente sus sistemas enzimáticos de defensa, principalmente la catalasa, están destinadas a la muerte celular por necrosis.

A diferencia de lo que ocurre con los peróxidos, los niveles de radical superóxido, van disminuyendo paulatinamente al aumentar la concentración de CsA. Esta disminución puede explicarse, bien por una eficiente eliminación del radical superóxido por acción de las superóxido dismutasas (Mn-SOD y CuZn-SOD) o por el aumento de la muerte celular a elevadas dosis del fármaco.

Los datos obtenidos referentes a los niveles de especies reactivas de oxígeno, parecen estar relacionados con la secuencia de pasos que conducen a la muerte celular, sugiriéndose que el aumento de especies reactivas de oxígeno, ha de preceder a la aparición de la toxicidad y muerte celular.

Una producción incrementada de especies reactivas de oxígeno, o una capacidad disminuida de los sistemas de defensa que las eliminan, da como resultado la situación de estrés oxidativo. Además estas especies reactivas pueden actuar en la cascada de reacciones implicadas en la transducción de señales y representar un mecanismo de control de la expresión génica. Se ha demostrado que la activación y unión al DNA de varios factores de transcripción (NF- κ B por ejemplo) depende del estado redox celular (108).

Los principales sistemas enzimáticos implicados en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno son las superóxido dismutasas (CuZn-SOD y Mn-SOD) y la catalasa. Por tanto, la generación de especies reactivas de oxígeno ha de traer consigo una respuesta en los sistemas antioxidantes endógenos para evitar la agresión oxidativa, ya que uno de los sistemas más importantes en la defensa celular frente a la toxicidad del oxígeno, lo constituye la acción concertada de estos dos enzimas. Basados en este hecho, evaluamos los efectos del tratamiento con CsA en la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo.

Los niveles de mRNA de la Mn-SOD (mitocondrial), la CuZn-SOD (citosólica) y la catalasa evaluados en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses incubados con CsA durante 24 horas, mostraron un progresivo aumento dependiente de la concentración del fármaco. Los niveles de los mensajeros de estas enzimas fueron siempre mayores en rata adulta. Sin embargo, parece ser que la capacidad de la respuesta frente al estrés oxidativo es mayor en las ratas jóvenes, ya que la magnitud de los incrementos en los niveles de los mRNA de los tres enzimas fue siempre superior en hepatocitos de rata joven frente adulta. Esto podría ser debido a que los niveles de mRNA en hepatocitos control de rata de 6 meses, son más elevados que en los de ratas jóvenes, lo que puede dificultar que el incremento sea más marcado.

Los incrementos más acusados en los niveles del mRNA, y que ocurren a concentraciones más bajas de CsA, corresponden a la Mn-SOD, enzima que se localiza en mitocondria. Es sabido que la CsA perturba la función mitocondrial actuando directa-

mente sober este orgánulo (43) provocando la acumulación de calcio que originará finalmente la alteración de la cadena de transporte electrónico con la consiguiente generación de especies reactivas de oxígeno (55). Este hecho podría explicar la más temprana y acusada inducción de la Mn-SOD (mitocondrial) con el objeto de eliminar el radical superóxido generado a este nivel subcelular.

La inducción de la expresión de la Mn-SOD junto con la de la CuZn-SOD, sería la responsable de la disminución de los niveles de radical superóxido desde concentraciones bajas de CsA en ambas edades.

Por otra parte, tanto en hepatocitos de rata joven como adulta, la inducción de la expresión de la catalasa fue menor, lo que facilitarí la acumulación de H_2O_2 a concentraciones bajas y medias del fármaco. A dosis elevadas de CsA tiene lugar una mayor inducción, pero alcanzando tan sólo valores de un 160% y un 130% frente a los controles en 2 y 6 meses respectivamente. Este hecho unido a la elevada muerte celular a estas concentraciones, ocasionarían la disminución de la emisión de diclorofluoresceína indicativo de que los niveles de peróxidos son menores.

De manera que, la correcta eficiencia de los sistemas encargados de eliminar el radical superóxido (generando a su vez H_2O_2), junto con la insuficiente eficacia en la eliminación del H_2O_2 por parte de la catalasa, provocaría la acumulación de esta especie reactiva de oxígeno la cual sería previa a la muerte celular por necrosis. La importancia del equilibrio entre la catalasa y la SOD, ha sido probada por otros investigadores en células epiteliales transformadas de ratón, donde un ligero incremento en la actividad de la SOD provoca la formación de cantidades masivas de peróxido de hidrógeno (4).

4.3. Influencia de la ciclosporina A y de la edad en la distribución del DNA en hepatocitos en cultivo primario.

Durante los años en los que se ha utilizado en clínica la CsA, se ha observado un aumento del desarrollo de diversos tipos de cánceres en pacientes tratados con este fármaco (92). Además, es frecuente que los trasplantes de hígado realizados a pacientes que han sufrido previamente un tumor primario hepático y han sido tratados con CsA fracasen debido a la elevada proporción de recurrencia de dichos tumores (117). Durante los últimos años, se ha investigado sobre los posibles papeles de la CsA en la modulación del crecimiento de tumores celulares utilizando diversos modelos de carcinogénesis experimental (140,48). Concretamente en el modelo de carcinogénesis hepática, se ha observado que la administración oral de CsA aumenta significativamente la aparición de lesiones preneoplásicas inducidas por agentes químicos carcinogénicos en hígado de rata (134). Aunque se desconocen aún los mecanismos precisos por los que la CsA facilita el desarrollo de estas lesiones preneoplásicas, la estimulación en la proliferación de células parenquimales hepáticas inducida por la CsA podría ser un factor importante (78). Varios investigadores han propuesto que la CsA facilita la respuesta regenerativa de hepatocitos en ratas y ratones tras una hepatectomía parcial (141,32), así como que estimula *in vivo* la proliferación de hepatocitos quiescentes en ratas no sujetas a la hepatectomía (78,66). Sin embargo, los estudios *in vitro* realizados con el objeto de establecer las causas de este efecto citoproliferativo, han reportado resultados contradictorios a los obtenidos *in vivo*, adjudicando un papel citostático en

diversos sistemas celulares (50,59). Concretamente en cultivos de hepatocitos se ha observado un modelo bifásico de efectos en función de la concentración de la CsA, siendo citostático a concentraciones superiores a $1\mu\text{M}$, pero citoproliferativo a concentraciones menores (134).

Por nuestra parte, decidimos realizar un estudio de la influencia de la CsA y la edad en la progresión de los hepatocitos a lo largo del ciclo celular y en la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), utilizando para ello la técnica de citometría de flujo que permite cuantificar el contenido en DNA de las células a la vez que nos informa de la proporción de éstas que han expresado el PCNA. De los resultados obtenidos se observa, en cultivos de células control, como la edad modifica el perfil de distribución de las células en función del contenido en DNA, tendiendo en hepatocitos de ratas de mayor edad hacia un estado de poliploidización, datos que concuerdan con los obtenidos por otros investigadores (38). Además, según los datos obtenidos de la cuantificación de la expresión del PCNA en células control, con la edad existe una tendencia hacia un estado más diferenciado (quiescencia).

La incubación de los cultivos con CsA durante 24 horas provocó, en los hepatocitos de ambas edades, una tendencia hacia la acumulación de las células en la fase G_2/M (tetraploide) a la vez que indujo la disminución de la población de células comprometidas en fase G_0/G_1 (diploide). Estos cambios en el perfil de distribución del DNA fueron más acusados cuanto mayor fue la dosis de CsA utilizada. También se apreció que el porcentaje de células en fase de síntesis S_2 sufrió una disminución en ambas edades al aumentar la concentración de CsA. Además, en hepatocitos de rata de 6 meses, se verificó un ligero descenso de la población octoploide (8C). Todos estos hechos parecen indicar que la CsA induce en los hepatocitos el abandono de la fase G_0/G_1 a la vez que provoca la acumulación de las células en G_2/M (136), posiblemente por inhibición de la transición $G_2 \rightarrow M$ o por alteración de alguna de las fases de la mitosis.

Los resultados obtenidos de la evaluación cuantitativa de la expresión del PCNA mostraron que la CsA induce, de manera dependiente de la dosis, una disminución de la población de células diploides quiescentes, consideradas como células 2C PCNA negativas. Este hecho junto con la detención de las células en la fase G_2/M , serían los responsables de la disminución de la población 2C y el aumento de la 4C. Curiosamente, los hepatocitos de rata de 6 meses, que en los controles presentan un estado de mayor quiescencia, son los que experimentan una mayor inducción a abandonar la fase G_0 .

De los resultados citométricos también se desprende la existencia de un porcentaje considerable de células apoptóticas en el control de hepatocitos de rata de 6 meses, siendo mucho menor en los de 2 meses, lo que posiblemente refleja una mayor sensibilidad de los hepatocitos de rata adulta a las condiciones del cultivo el cual puede carecer de las citoquinas y factores de crecimiento necesarios. Además, existen estudios que demuestran que los hepatocitos en cultivo sufren un proceso de ruptura del DNA muy lento, pero que se incrementa con la duración del cultivo (16). La cuantificación del pico hipodiploide en los cultivos de hepatocitos tratados con CsA, reveló que esta droga a dosis bajas parece tener un efecto inhibitorio de la apoptosis, mientras que a concentraciones elevadas (25 y $50\mu\text{M}$) tiene un efecto opuesto facilitando la muerte celular programada, la cual debe coexistir con la necrosis según los datos obtenidos por la liberación de LDH al medio de cultivo.

Otro hecho que nos ha revelado la evaluación de la expresión del PCNA, es que la relación entre el porcentaje de células apoptóticas PCNA positivas y el porcentaje de células apoptóticas totales, aumenta paralelamente a la concentración de CsA. Este dato podría indicar que parte de las células que abandonan el estado quiescente para entrar y proceder a lo largo del ciclo celular, no finalizan dicho ciclo y lo abandonan para morir por apoptosis.

En resumen, los resultados de este trabajo, ponen de manifiesto la influencia del desarrollo sobre los efectos hepatotóxicos de la CsA a niveles tales como la producción de especies reactivas de oxígeno, la expresión génica de sistemas antioxidantes, la ploidía y distribución del DNA y la muerte celular. Estos resultados abren camino para investigar la influencia de la senescencia sobre la toxicidad de este fármaco ya que el envejecimiento se caracteriza por la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno. La modulación de la toxicidad de la CsA mediante el empleo de antioxidantes es otro de los objetivos que se plantea en investigaciones futuras.

5. CONCLUSIONES

1. La citotoxicidad de la ciclosporina A, evaluada por la liberación de lactato deshidrogenasa al medio, es dependiente de la concentración del fármaco, del tiempo de incubación (3, 18, 24 horas) y de la edad, mostrándose más intensa, más temprana y a concentraciones más bajas en hepatocitos de rata adulta.

2. Como resultado de la exposición de las células a diferentes concentraciones de ciclosporina A durante 24 horas de incubación, se generan especies reactivas de oxígeno. En el caso del peróxido de hidrógeno los niveles alcanzan su máximo a la concentración de 1 μ M en hepatocitos de rata joven y de 10 mM en hepatocitos de rata adulta, mientras que los niveles del radical superóxido muestran una disminución similar en ambas edades.

3. La inducción de los sistemas antioxidantes enzimáticos Mn-SOD, CuZn-SOD y catalasa es más acusada en hepatocitos de rata joven confiriéndoles una mayor capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo. Sin embargo, la diferencia que existe en el grado de inducción entre las SOD y la catalasa origina, en ambas edades, la acumulación de peróxido de hidrógeno debido a una pérdida de coordinación entre ambos sistemas.

4. La acumulación de especies reactivas de oxígeno precede a la inducción de la expresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes, y a la aparición de la toxicidad.

5. El tratamiento de los hepatocitos con ciclosporina A durante 24 horas, induce el abandono del estado quiescente (evaluado por la expresión del PCNA), a la vez que provoca la acumulación de las células en la fase G₂/M, siendo estos hechos más acusados en hepatocitos de rata adulta.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Actis GC, Debernardi-Venon W, Lagget M, Marzano A, Ottobrelli A, Ponzetto A, Rocca G, Boggio-Bertinet D, Balzola F, Bonino F y Verme G. Hepatotoxicity of intravenous cyclosporine A in patients with acute ulcerative colitis on total parenteral nutrition. *Liver* **15**, 320-323 (1995).
2. Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, Veronese S, Mauri FA, Gambacorta M, Pollo B, Dalla-Palma P y Barbareschi M. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch (A)* **419**, 417-423 (1991).
3. Alleva R, Tomassetti M, Battino M, Curatola G, Littarru GP y Folkers K. The roles of coenzyme Q₁₀ and vitamin E on the peroxidation in human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9388-9391 (1995).
4. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I y Cerutti P. The balance between Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* **30**, 9305-9313 (1991).
5. Arias IM. Cyclosporin, the biology of the bile canaliculus, and cholestasis. *Gastroenterology* **104**, 1558-1560 (1993).
6. Azer SA y Stacey NH. Differential effects of cyclosporin A on the transport of bile acids by human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **46**, 813-819 (1993).
7. Barja G. Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad de crecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **31**, 153-161 (1996).
8. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC y Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**, 1910-1917 (1983).
9. Bennett WM y Norman DJ. Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med* **37**, 215-224 (1986).
10. Bensasson R, Land EJ y Maudinas B. Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation. *Photochem Photobiol* **23**, 189-193 (1976).
11. Bergmeyer HU, Gawehn K y Grassl M. En: *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed HU Bergmeyer), pp 512-513, Verlag Chemie, Weinheim (1974).
12. Böhme M, Jedlitschky G, Leier I, Büchler M y Keppler D. ATP-dependent export pumps and their inhibition by cyclosporins. En: *Advances in Enzyme Regulation* (G. Weber, ed.) **Vol 34**, pp 371-380. Pergamon Press, Tarrytown (1994).
13. Bohr VA y Anson RM. Mutation Research DNAGing genetic instability and aging. *Mutat Res* **338**, 25-34 (1995).
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
15. Burton GW y Ingold KV. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**, 569-573 (1984).
16. Cain K, Salmaan H, Hussain I, Covet C, Quin H y Oberhammer F. A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocytes undergo a time dependent increase in DNA cleavage and chromatin condensation which is augmented after TGF- β 1 treatment. *Cytometry* **23**, 312-321 (1996).

17. Cardoso M, Leonhardt H y Nadal-Ginnard B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication. *Cell* **74**, 979-992 (1993).
18. Chanussot F, Botta-Fridlung D, Porte PL, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Hauton J, Gauthier A y Lafont H. Effects of cyclosporine and corticosteroids on bile secretion in the rat. *Transplantation* **54**, 226-231 (1992).
19. Chomzynski K y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159 (1987).
20. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* **14**, 126-130 (1993).
21. Cotgreave IA, Modeus P y Orrenius S. Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **28**, 189-212 (1988).
22. Crissman HA, Stevenson AP, Kissane RJ y Tobey RA. Techniques for quantitative staining of cellular DNA for flow cytometric analysis. En: *Flow Cytometric and Sorting*. (eds MR Melamed, PF Mullaney, ML Mendelsohn). pp 243-261. John Wiley and Sons, New York (1979).
23. Dallas CE y Evans DL. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* **345**, 557-558 (1990).
24. Davies KJA, Sevanian A, Muakassah-Kelly SP y Hochstein PA. Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem J* **235**, 747-754 (1986).
25. De la Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J y Viña J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* **10**, 333-338 (1996).
26. Del Rio LA, Sandalio L, Palma J, Bueno P y Corpas PJ. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biol Med* **13**, 557-580 (1992).
27. Di Mascio P, Murphy Me y Sies H. Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* **53**, S194-S200 (1991).
28. Elstner EF. Oxygen radicals - biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr* **69**, 949-956 (1991).
29. Evans HM y Bishop KS. On the existence of hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**, 650-651 (1922).
30. Evans MJ, Shami SG y Wells JR. Quantitative techniques for morphological evaluation. En: *Handbook Toxicol Pathol* (eds MH Wanda y CG Rousseaux). pp 37-48. Academic Press, Inc (1991).
31. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* **65**, 899-910 (1894).
32. Francavilla A, Barone M, Todo S, Zeng Q, Parter K y Starzl TE. Augmentation of rat liver regeneration by FK506 compared with cyclosporine. *Lancet* **ii**, 1007-1011 (1989).
33. Freeman DJ. Pharmacology and pharmacokinetics of cyclosporine. *Clin Biochem* **24**, 9-14 (1991).
34. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880 (1978).
35. Fridovich I. Superoxide dismutases. *J Biol Chem* **264**, 7761-7764 (1989).
36. Galán AI, Fernández E, Morán D, Muñoz ME y Jiménez R. Cyclosporine A hepatotoxicity: Effect of prolonged treatment with cyclosporine on biliary lipid secretion in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **22**, 260-265 (1995).
37. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC.

- Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcriptional nuclear factor- κ B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* **48**, 825-834 (1995).
38. Gerlynk P, Abyholm A, Grotmos T, Erikstein B, Huitfeldt HS, Stokke T y Seglen PO. Binucleation and polyploidization pattern in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Proliferation*. **26**, 557-565 (1993).
 39. Granelli-Piperno G. Lymphokine gene expression *in vivo* is inhibited by cyclosporine A. *J Exp Med* **171**, 533-544 (1990).
 40. Grevel J, Kutz K, Abish E y Nueesch E. Evidence for zero order absorption of cyclosporine. *Br J Clin Pharmacol* **22**, 220P (1986).
 41. Haanen C y Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflammation* **4**, 5-15 (1995).
 42. Haber F y Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc London Serie A* **147**, 332-351 (1934).
 43. Halestrap AP y Davidson AM. Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondria-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* **268**, 153-160 (1990).
 44. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res Commun* **9**, 1-32 (1990).
 45. Halliwell B y Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**, 501-514 (1986).
 46. Halliwell B y Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Oxford University Press, New York (1991).
 47. Harmon D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* **257**, 257-266 (1992).
 48. Hattari A, Kunz HW, Gill TJ, Pan SF y Shinozuka H. Diversity of the promoting action of cyclosporine on the induction of lymphoid tumors. *Carcinogenesis* **9**, 1091-1094 (1988).
 49. Hunt JV, Bottoms MA y Mitchinson MJ. Ascorbic acid oxidation: a potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in diabetes mellitus. *FEBS Lett* **311**, 161-164 (1992).
 50. Ikeda H y Fujiwara K. Cyclosporin A and FK-506 in inhibition of rat Ito cell activation *in vitro*. *Hepatology* **21**, 1161-1166 (1995).
 51. Imlay JA y Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309 (1988).
 52. Inselmann G, Hannemann J y Baumann K. Cyclosporine A induced lipid peroxidation and influence on glucose-6-phosphatase in rat hepatic and renal microsomes. *Res Commun Chem Pathol Pharm* **68**, 189-203 (1990).
 53. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83-86 (1996).
 54. Jones DP. The role of oxygen concentration in oxidative stress: Hypoxic and hyperoxic models. En: *Oxidative Stress* (ed H Sies). pp 273-309 Academic Press, New York-London (1985).
 55. Jung K y Pergande M. Influence of cyclosporine A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett* **183**, 167-169 (1985).
 56. Jung K, Reinholdt C y Scholz P. Inhibited efficiency of kidney mitochondria isolated from rats treated with cyclosporine A. *Nephron* **45**, 43-45 (1987).

57. Kahan BD, Mickey R, Flechner SM, Lorber MI, Wideman CA, Kerman RH, Tersaki P y Van Buren CT. Multivariate analysis of risk factors impacting on immediate and eventual cadaver allograft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* **43**, 65-70 (1987).
58. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* **321**, 1725-1738 (1989).
59. Karashima T, Hachisuka H y Sasai Y. FK506 and cyclosporine A inhibit growth factor-stimulated human keratinocyte proliferation by blocking cells in the G0/G1 phases of the cell cycle. *J Dermatol Sci* **12**, 246-254 (1996).
60. Kasaian MT y Biron CA. Cyclosporine A inhibition of interleukin 2 gene expression, but not natural killer cell proliferation, after induction *in vivo*. *J Exp Med* **171**, 299-306 (1990).
61. Ke H, Zydowsky LD, Liu J y Walsh CT. Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 9483-9487 (1991).
62. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* **23**, 21-48 (1993).
63. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-640 (1997).
64. Kelner MJ y Bagnell R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. *J Biol Chem* **265**, 10872-10875 (1990).
65. Kim PCW, Cohen Z, Wong PY, Craig M, Cullen J y Levy GA. Cyclosporine A vs cyclosporine A metabolites: comparison of *in vivo* and *in vitro* immunosuppressive and toxic effects. *Transplant Proc* **22**, 2487-2490 (1990).
66. Kim YI, Kobayashi M, Egashira T, Kawano K, Morimoto A, Kai T y Shimada T. Augmentation of hepatocyte proliferation by immunosuppressant pretherapy is associated with up-regulation of malondialdehyde production. *Res Exp Med* **193**, 337-345 (1993).
67. Krebs HA, Cornell NE, Lund P y Hems R. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism*. (eds F Lundsquist y N Tygstrup). pp 726-750, Copenhagen, Munksgaard (1974).
68. Kronbach T, Fisher V y Meyuer UA. Cyclosporin metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporin-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporin with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* **43**, 630-635 (1988).
69. Lemaire M y Tillement JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the *in vitro* binding and distribution of cyclosporine A in the blood. *J Pharm Pharmacol* **34**, 715-718 (1982).
70. Lennon SV, Martin SJ y Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation* **24**, 203-214 (1991).
71. Lezza AMS, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P y Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 772-779 (1994).
72. Li R, Wage S, Hannon CJ, Beach D y Stillmann B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* **371**, 534-537 (1994).
73. Linden MD, Torres FX, Kubus J y Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *J Clin Pathol* **97**, Suple. 1, S4-S13 (1992).

75. Liu J y Mori A. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Dev* **71**, 23-30 (1993).
76. Majno G y Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15 (1995).
77. Maloney AG, Schmucker DL, Vessey DS y Wang RK. The effects of aging on the hepatic microsomal mixed-function oxidase system of male and female monkeys. *Hepatology* **6**, 282-287 (1986).
78. Masuhara M, Ogasawara H, Katyal SL, Nakamura T y Shinozuka H. Cyclosporine stimulates hepatocyte proliferation and accelerates development of hepatocellular carcinomas in rats. *Carcinogenesis* **14**, 1579-1584 (1993).
79. Mattson MP, Barger SW, Begley JG y Mark RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. En: *Cell death, methods in Cell Biology* (eds LM Schwartz y BA Osborne) **V01 46**, pp187-216, Academic Press (1995).
80. Maurer G, Loosli HR, Schreier E y Keller B. Disposition of cyclosporine in several animal species and man: I. Structural elucidation of its metabolites. *Drug Metab Dispos* **12**, 120-126 (1983).
81. McCord JM y Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055 (1969).
82. Nickell SP, Scheibel LW y Cole GA. Inhibition by cyclosporine A of rodent malaria *in vivo* and human malaria *in vitro*. *Infect Immun* **37**, 1093-1100 (1982).
83. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* **54**, 1119S-1124S (1991).
84. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E y Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* **53**, 201S-205S (1991).
85. Northrop JP, Ullman KS y Crabtree GR. Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex. *J Biol Chem* **268**, 2917-2923 (1993).
86. Norwood TH y Gray M. The role of DNA damage in cellular aging: is it time for a reassessment? *Exp Gerontol* **31**, 61-68 (1996).
87. Nurse P. Universal control mechanism regulating on set of M-phase. *Nature* **344**, 503-508 (1990).
88. Obregón L, Duque I, Rodriguez-Puyol D, Lamas S, López-Nova JM y Hernando L. Role of reactive oxygen species (ROS) on cyclosporin A nephrotoxicity. Studies on isolated rat glomeruli. *Eur J Clin Invest* **19**, parte 2, A 47 (1989).
89. Orrenius S. En: Free radicals: from basic science to medicine. Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds). Basel, Birkhäuser Verlag, pp 47-64 (1993).
90. Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M y Barja G. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev* **86**, 53-66 (1996).
91. Pellicciari C, Mangiarotti R, Bottone MG, Danova M y Wang E. Identification of resting cells by dual-parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry* **21**, 329-327 (1995).
92. Penn I. Cancers following cyclosporine therapy. *Transplantation* **43**, 32-35 (1987).

93. Peter M y Herskowitz I. Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79**, 181-184 (1994).
94. Porter TD y Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **266**, 13469-13472 (1991).
95. Prueksaritanont T, Correia MA, Rettie AE, Swinney DC, Thomas PE y Benet LZ. Cyclosporine metabolism by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **21**, 730-737 (1993).
96. Reid M, Gibbon S, Kwok D, Van Buren CT, Flechner S y Kahan BD. Cyclosporine levels in human tissues of patients treated for one week to one year. *Transplant Proc* **15**, 2434-2438 (1983).
97. Remuzzi G y Perico N. Cyclosporin-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int [Suppl]* **52**, S70-S74 (1995).
98. Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J Biochem Cell Biol* **27**, 647-653 (1995).
99. Rikans LE. Influence of aging on chemically induced hepatotoxicity. Role of age-related changes in metabolism. *Drug Metab Rev* **20**, 87-110 (1989).
100. Rothe G y Valet G. Flow cytometry analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukocyte Biol* **47**, 440-448 (1990).
101. Sandberg AA. The chromosomes and the cell cycle. En: *Diagnostic Cytology*. eds LG Koss, JB Lippincott. 4ª ed. **Vol I**. pp 154-179. Company, Philadelphia (1992).
102. Sanz N, Díez-Fernández C y Cascales M. Variations of hepatic antioxidant systems and DNA ploidy in rats aged 2 to 8 months. *Biochim Biophys Acta* **1315**, 123-130 (1996).
103. Sanz N, Díez-Fernández C, Alvarez A y Cascales M. Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* **27**, 525-534 (1997).
104. Saran M y Bors W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin Wochenschr* **69**, 957-964 (1991).
105. Schlegel J, Meier P, Kass GEN y Richter C. Inhibition by cyclosporine A of the prooxidant-induced but not the sodium-induced calcium release from rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* **42**, 2193-2197 (1991).
106. Schmucker DL. Aging and drug disposition. En: *Review of biological research in aging*. (ed M Rothstein). **Vol II**. pp 465-501, Alan L Liss, New York (1985).
107. Schmucker DL y Wang RK. Effects of aging and phenobarbital on the rat liver microsomal drug metabolizing system. *Mech Aging Dev* **15**, 189-202 (1981).
108. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandervoorde V, Haegeman G y Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effect of TNF. *EMBO J* **12**, 3095-3104 (1993).
109. Seglen PO. Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion. En: *In vitro biological systems*. (ed CA Tyson y JM Frazier). **Vol I**. pp 231-244, Academic Press, London (1993).
110. Sherr CJ. G1 phase progression: Cyclin on cue. *Cell* **79**, 551-555 (1994).
111. Sigal NH y Dumont FJ. Immunosuppression. En: *Fundamental immunology*. (Paul WE, ed). Tercera edición. 903-915. New York: Raven Press (1993).
112. Simpson JF, Dutt L y Page DL. Expression of mitoses per thousand cells and cell density in breast carcinomas. *Hum Pathol* **26**, 608-611 (1992).

113. Skett P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/ metabolism-based toxicity testing. Solutions? *Toxicology in Vitro* **8**, 491-504 (1994).
114. Slater LM, Sweet P, Stupecky M y Gupta S. Cyclosporine A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia *in vitro*. *J Clin Invest* **77**, 1405-1408 (1986).
115. Spearman ME y Leibman LS. Aging selectively alters glutathione-S-transferase isoenzyme concentration in liver and lung cytosol. *Drug Metab Dispos* **12**, 661-671 (1984).
116. Stadtman ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr* **54**, 1125S-1128S (1991).
117. Starzl TE, Demetris AJ y Van Thiel D. Liver transplantation. *N Engl J Med* **321**, 1014-1021 (1989).
118. Stein GH, Beeson M y Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science*. **249**, 666-668 (1990).
119. Storb R et al. Graft-versus-host disease prevention by methotrexate combined with cyclosporine compared to methotrexate alone in patients given marrow grafts for severe aplastic anemia: long-term follow-up of a controlled trial. *Br J Haematol* **72**, 567-572 (1989).
120. Sutherland DER, Moudry KC y Fryd DS. Results of pancreas-transplant registry. *Diabetes* **38**, 46-54 (1989).
121. Takahashi N, Hayano T y Suzuki M. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473-475 (1989).
122. Tamura J, Tanaka J, Fujita KI, Yoshida M, Kasamatsu T, Arai S y Tobe T. Cell kinetics of regenerating liver after 70% hepatectomy in rats. 2-color flow cytometric analysis. *HPB Surg* **5**, 103-114 (1992).
123. Thieriault Y, Logan TM, Meadows R, Yu L, Holzman TF, Simmer RL y Fesik SW. Solution structure of the cyclosporine A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* **361**, 88-91 (1993).
124. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
125. Tuena De Gómez-Poyou M, Gavilanes M, Gómez-Poyou A y Ernster L. Control of activity states of heart mitochondrial ATPase. Role of proton-motive force and Ca²⁺. *Biochim Biophys Acta* **592**, 396-405 (1980).
126. Venkataramanan R, Burckart GJ y Ptachcinski RJ. Pharmacokinetics and monitoring of cyclosporine following orthotopic liver transplantation. *Semin Liver Dis* **5**, 357-368 (1985).
127. Vessey DA y Kelley M. Inhibition of bile acid conjugation by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* **1272**, 49-52 (1995).
128. Vielh P, Magdelénat H, Remvikos Y y Dutrillaux B. Analysis of DNA content. En: *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Flow Cytometric*. (ed P Vielh). pp 21-57. Igaku-Shoin, New York-Tokyo (1991).
129. Vindelov LL, Christensen IJ y Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* **3**, 323-327 (1983).
130. Wenger RM. Synthesis of ciclosporin and analogues: structural and conformational requirements for immunosuppressive activity. *Prog Allergy* **38**, 46-64 (1986).
131. Wolf A y Broadhurst M. Cyclosporin A (Sandimmun) induces the formation of free reactive oxygen species *in vitro* in rat liver and kidney microsomes. En: *Oxygen Radicals*, ed Yagi K, Kondo

- M, Niki E, Yoshikawa. pp 525-528, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1992).
132. Wolf A, Trendelenburg CF, Díez-Fernández C, Prieto P y Cordier A. Role of glutathione in cyclosporine A *in vitro* hepatotoxicity. *Transplant Proc* **26**, 2912-2914 (1994).
 133. Wolf A, Trendelenburg CF, Díez-Fernández C, Prieto P, Houy S, Trommer WE y Cordier A. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *Journal Pharmacol Exp Toxicol* **280**, 1328-1334 (1997).
 134. Yabu K, Watty VS y Shinozuka H. Cyclosporine enhances the growth of carcinogen-induced enzym altered foci in rat liver. *Hepatology* **13**, 304-309 (1991).
 135. Yamamoto K, Takahashi M y Niki E. Role of iron and ascorbic acid in the oxidation of methyl linoleate micelles. *Chem Lett* 1149-1152 (1987).
 136. Yamamoto M, Baba H, Kusumoto T, Sakaguchi Y, Maehara Y, Kuwano M y Sugimachi K. Cyclosporin A and FK506 reverse anthracycline resistance by altering the cell cycle. *Anticancer Drugs* **6**, 570-577 (1995).
 137. Yim MB, Chock PB y Stadtman ER. Copper-zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Nat Acad Sci USA* **87**, 5006-5010 (1990).
 138. Yim MB, Chock PB y Stadtman ER. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem* **268**, 4099-4105 (1993).
 139. Yokoyama I, Hayashi S, Sato E, Kobayashi T, Negita M, Uchida K y Takagi H. Enhancement of tumor proliferation by cyclosporine A in early phase of experimental hepatic metastasis. *Jpn J Cancer Res* **85**, 704-709 (1994).
 140. Yokota K, Hattori A, Kunz HW, Gill TJ y Shinozuka H. Experimental analysis of the effects of cyclosporine on the induction and growth of epithelial tumors. *Transplant Proc* **21**, 3211-3214 (1989).
 141. Yoshimura S y Kamada N. Effect of cyclosporine A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mouse. *Transplant Proc* **21**, 911-912 (1989).
 142. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**, 139-162 (1994).

AVANCES EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE COLON Y RECTO *

JESÚS MARTÍNEZ-FALERO

EPIDEMIOLOGÍA

Los tumores malignos del colon y recto, concretamente el carcinoma, es una enfermedad frecuente dentro de la patología digestiva. En nuestro medio y en los años sesenta, representaba el 10% de todas las neoplasias, aproximadamente la mitad que el carcinoma de estómago.

En la actualidad las estadísticas registran un aumento. Ahora vemos más de una neoplasia de colon, por cada dos de estómago.

La edad más frecuente es entre los 40-70 años, quizá la máxima incidencia sea alrededor de los 60 años.

Los factores genéticos relacionados con la herencia familiar, no están bien determinados y ahora se discuten, como veremos después. Si sabemos que hay enfermedades intestinales, que son hereditarias, como la poliposis familiar que puede degenerar.

En relación con el sexo, parece que hay más incidencia del carcinoma de colon en mujeres y carcinoma de recto en hombres.

Los índices de mortalidad más elevados se encuentran en Europa occidental y mundo anglosajón norteamericano. Cifras intermedias en Europa del este y mediterráneo no africano. Las más bajas se dan en centro de Africa, Asia y Sudamérica, con excepción de Argentina y Uruguay, que son iguales a las de América del Norte.

Estas diferencias geográficas, no explicadas por motivos raciales, étnicos o genéticos, han llevado a los investigadores a considerar como importantes factores económicos, sociales y alimentarios.

* Conferencia pronunciada el 17 de marzo de 1999.

Se encuentra una correlación directa entre países de mayor renta *per capita*, más desarrollados y la incidencia del cáncer de intestino grueso; pero también esto tiene excepciones: Japón, con renta siete veces más alta que Rumanía, por ejemplo, y la mortalidad es parecida.

La dieta es un factor muy importante. En principio se pensó en la relación de alta incidencia del carcinoma de colon y la ingestión excesiva de proteínas, grasas y azúcar refinada y se comprobó que existía esta correlación.

Actualmente se da mayor importancia a otro componente de la dieta y que va unido con el anterior y es la pobreza de fibras vegetales absorbibles, que se lleva en los países desarrollados por mayor consumo de proteínas y grasas animales. Una alimentación con abundancia de estos dos principios inmediatos, favorece el establecimiento de una flora bacteriana, que produce unas enzimas, que actuarían sobre los ácidos biliares y a través de complicados procesos metabólicos originan sustancias carcinogénicas, que serían fijadas o neutralizadas por ciertos componentes que existen en las fibras vegetales, lignina y algunos polisacáridos, que al acelerar el tránsito intestinal, suponen menor tiempo de contacto con los elementos carcinogénicos. Estas ideas, aún en revisión, tienen el respaldo de un hecho muy relacionado con la dieta: los habitantes de países que tienen baja incidencia de carcinoma de intestino grueso, como son los medios rurales de África llevan una dieta pobre en proteínas y grasas y rica en fibras vegetales.

En cuanto a los factores genéticos, últimamente se piensa que se trate de una anomalía con ausencia de un fragmento del cromosoma 5.

En este sentido científicos ingleses, han publicado estudios en la revista Nature de la Fundación Imperial contra el Cáncer y han observado cariotipos, con alteraciones del par 5, incluso con ausencias en casos de cáncer de colon desarrollado.

Los estudios de Manuel Perucho, hechos en California en 1997, nos indican que aproximadamente el 15% de los tumores del tracto gastrointestinal poseen el gen MMP, fenotipo mutador de satélites, que es recesivo y que los tumores de este tipo tienen una respuesta menor al tratamiento convencional, puesto que son células del fenotipo del camaleón, es decir que están cambiando continuamente, de tal manera que cuando proponemos tratarlas con alguna droga que intenta inactivar una serie de efectos, la célula adquiere otras propiedades nuevas. Perucho trata de explicar el hecho, diciendo «que estas células al tener el fenotipo mutador tan exacerbado, no son tan agresivas y unos estudios han comprobado que las células tumorales con el gen MMP cambian los antígenos de histocompatibilidad, es decir, tienen una habilidad para ocultar los antígenos que normalmente se expresan en la superficie de las células tumorales y que hacen que sean agredidas por las células T, y por esto se escapan al ataque inmunológico.»

Por todos estos estudios dice Perucho: «que el cáncer es un enorme puzle del que cada vez conocemos más piezas que van siendo más pequeñas.»

ETIOPATOGENIA

En el momento actual aún no se conoce la etiología del cáncer de colon. Los factores antes reseñados son hipótesis. Si sabemos que hay lesiones que predisponen al cáncer de colon:

1. ADENOMAS VELLOSO
2. POLIPOSIS FAMILIAR. Antes se decía que era necesario la existencia de más de cien pólipos para considerarla así. A veces es una alfombra de pólipos en todo el colon. Ahora se fija en un número más bajo, entre treinta y cincuenta pólipos. Esta poliposis es de origen genético dominante, no ligada al sexo, es familiar y hereditaria.

Teniendo en cuenta la histopatología se distinguen las siguientes formas: tubular, veloso y tubuloveloso. El gen de la poliposis familiar ha sido identificado en el cromosoma 5. No aparece antes de los diez años y rara vez después de los cincuenta. La poliposis familiar tiene estas variantes:

- Síndrome de Gardner: enfermedad autosómica dominante con poliposis adenomatosa, osteomas, quistes epidermoides y fibromas.
 - Síndrome de Turcot: enfermedad autosómica recesiva con poliposis adenomatosa y tumores del sistema nervioso central.
 - Síndrome de Peutz-Jeghers: poliposis gastrointestinal y pigmentación mucocutánea.
 - Síndrome de Cronkhite-Canadá: poliposis gastroduodenal, intestinal, diarreas y síndrome de mal absorción, acompañada de alteraciones ectodérmicas como: alopecia, distrofias ungeales e hiperpigmentación.
3. COLITIS ULCEROSA
 4. ENFERMEDAD DE CROHN
 5. DIVERTÍCULOS EN EL COLON

ANATOMÍA PATOLÓGICA

1. MACROSCÓPICA. Hay formas:
 - Proliferativas: puede partir de pólipo sesil que crece desmesuradamente hasta obstruir la luz intestinal, con ulceraciones consecutivas, por falta de irrigación. Es más frecuente en el colon derecho.
 - Infiltrativas: la propagación se hace más hacia la pared intestinal y menos hacia la luz. Es más pequeña, de crecimiento concéntrico, alrededor de la circunferencia intestinal, m recuente en el colon izquierdo.
 - Puede haber formas mixtas de las dos anteriores.

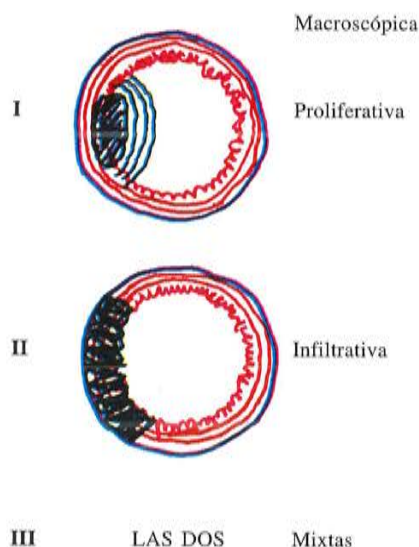


FIGURA 1. Anatomía patológica.

2. MICROSCOPICA. Para relacionar las características citológicas intrínsecas de malignidad del tumor y su evolución clínica, Broders en 1926, propuso su clasificación según el porcentaje de mitosis atípicas:

GRADO I: 25%

GRADO II: 50%

GRADO III: 75%

GRADO IV: 100%

No siempre hay correspondencia entre esta clasificación y el pronóstico y evolución de la enfermedad. Para hacer esta valoración es más aconsejable la clasificación de Dukes, patólogo del Hospital de San Marcos de Londres, que en 1932, estableció, primero para el cáncer de recto, pero que después se ha hecho extensiva a partir de 1945, para el cáncer de colon. Se fundamenta en la propagación e invasión del tumor en el estudio anatomopatológico de piezas resecaadas y la clasificación es así:

- DUKES A. El tumor queda limitado a la pared del colon sin pasar a la serosa.
- DUKES B. Se propaga a tejidos vecinos, afecta a la serosa y no a gánглиos linfáticos
- DUKES C. Con afectación de gánглиos: C1, gánглиos locales; C2, gánглиos de la región.
- DUKES D. Con metástasis a distancia: hígado, pulmón, huesos.

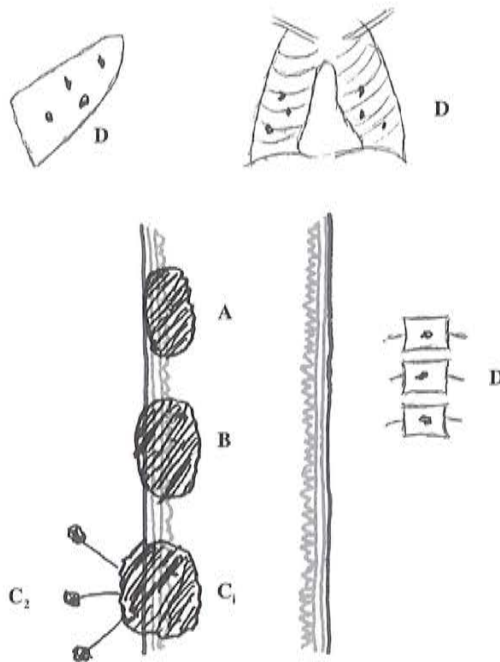


FIGURA 2. *Esquema Duker.*

CUADRO CLÍNICO

Hay que tener presente al estudiar el cuadro clínico del cáncer de colon, que en el comienzo apenas da manifestaciones clínicas, y muchas veces, cuando se hace el diagnóstico, el tumor está en una fase más o menos avanzada.

El síntoma más frecuente, la hemorragia a través del recto, bien en forma de sangre oculta en las heces, o visible en la deposición.

Es importante valorar los hábitos intestinales, el pasar de ritmo normal a estreñimiento o diarrea, sobretodo si el paciente es mayor de cuarenta años.

El dolor abdominal, suele aparecer cuando el tumor tiene cierta magnitud y penetra en tejidos próximos a la localización, en ocasiones se llega a la obstrucción intestinal; en estos casos se puede palpar la masa tumoral.

En el cáncer de recto el dolor es referido al canal anal y al sacro; hay importante tenesmo y el calibre de las heces, cuando son formadas, es un síntoma indicador. Nunca se debe omitir el tacto rectal como primera exploración, para apreciar: tono del esfínter, hipertrofias, nódulos, estenosis, dureza en la pared y mancha de sangre en el guante.

A estos síntomas hay que añadir los generales de proceso maligno: astenia, anorexia, mal estado general, pérdida de peso, anemia. Cuando estos síntomas están presentes, hay que pensar en períodos avanzados de la evolución.

Para recordar la localización en términos generales del tumor en el intestino grueso y su reparto puede ser útil la figura 3:

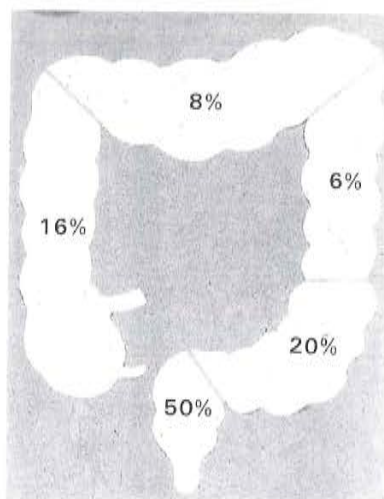


FIGURA 3.

Según esta localización se pueden señalar tres formas clínicas: colon derecho, colon izquierdo y recto. Como valor didáctico y de orientación clínica, en tanto se precisa la localización con los medios diagnósticos que después diremos, nos puede ser de utilidad para significar las formas clínicas los datos que analizamos en la figura 4:

FORMAS CLÍNICAS			
SINTOMAS	COLON DERECHO	COLON IZQUIERDO	RECTO
Dolor	<i>A veces precoz Crisis cólicas</i>	<i>Variable, continuo Plenitud, flatulencia</i>	<i>Inicio: tenesmo Tardío: dolor sacro</i>
Ritmo intestinal	<i>Diarrea</i>	<i>Estreñimiento</i>	<i>Estreñ. constante</i>
Obstrucción	<i>Poco frecuente</i>	<i>Más frecuente</i>	<i>Rara</i>
Hemorragias	<i>Poco copiosas Menos frecuentes Melenas Aparición tardía</i>	<i>Más abundantes Más frecuentes Sangre roja Aparición precoz</i>	<i>Cuántia variable Muy frecuentes Sangre roja Muy precoz</i>
Estado general	<i>Mal estado general Caquexia en estadio final</i>	<i>Mejor estado general Final por complicación oclusión</i>	<i>Mejor estado general Final por complicación, perforación</i>

FIGURA 4.

DIAGNÓSTICO

Hay que apresurarse a decir, la importancia que tiene el diagnóstico precoz, en las primeras fases de evolución, pues de ello va a depender el éxito del tratamiento quirúrgico, hasta poder llegar a la curación.

Las exploraciones necesarias para el diagnóstico se centran en tres áreas: radiología, colonoscopia, biopsia y hemorragias ocultas, ésta última, hoy con menos interés.

Radiología

En los estados precoces se puede observar en la radiografía alguna zona de rigidez e infiltración limitada en el borde del colon. Otras veces como si fuera una laguna de límites muy precisos. Figura 5:

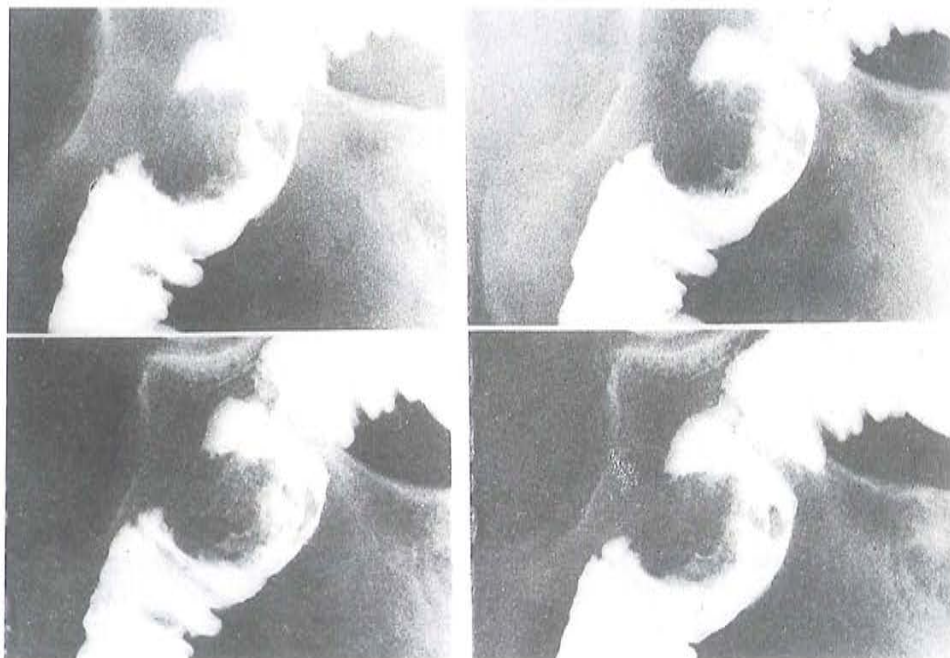


FIGURA 5.

Cuando la infiltración progresa se llega a la imagen más frecuente del cáncer de colon, que es la forma estenosante, en «servilletero» o «corazón de manzana», figura 6).

Colonoscopia

Prescindimos de detalles de preparación y técnica instrumental, que hoy se hace con fibroscópios flexibles muy cómodos. Las imágenes que nos proporciona este método son:

- Formas úlcero-vegetantes que ocupan casi toda la luz del colon. La zona de implantación es amplia, los límites con la mucosa sana están bien definidos, el contorno es irregular, con úlceras pequeñas superficiales, que sangran fácilmente al contacto con el instrumento. La coloración resalta sobre la mucosa sana, que

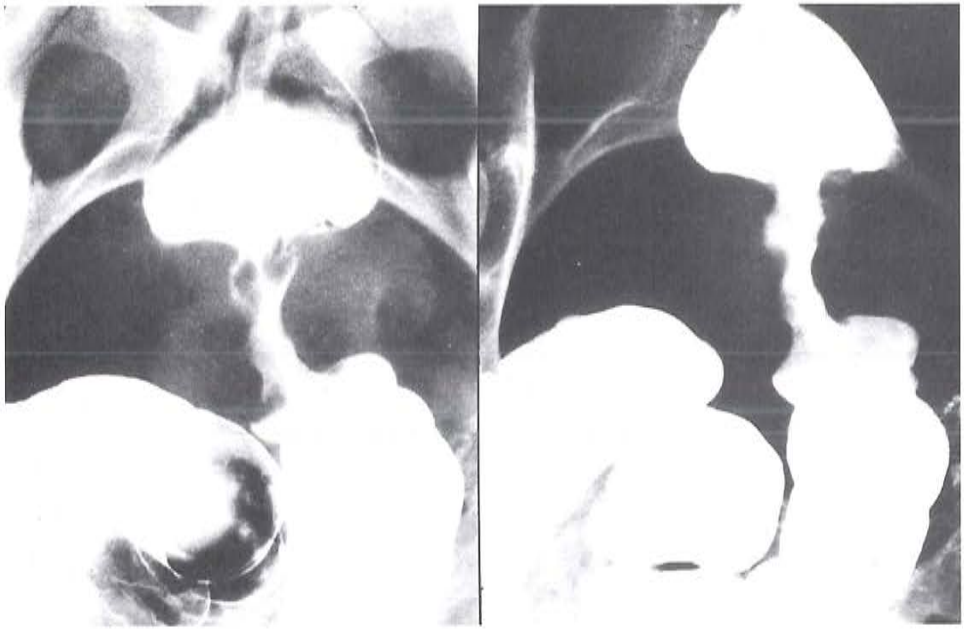


FIGURA 6.

rodea al tumor. La localización preferente es en el ciego, colon derecho y recto.
Figura 7:



FIGURA 7.

- Formas estenosantes que presentan una típica imagen con un rodete definido que resalta en la luz del colon y ocupa casi toda ella. Figura 8:



FIGURA 8.

Estudio macroscópico

Algunos de nuestros casos. Figuras 9 y 10:

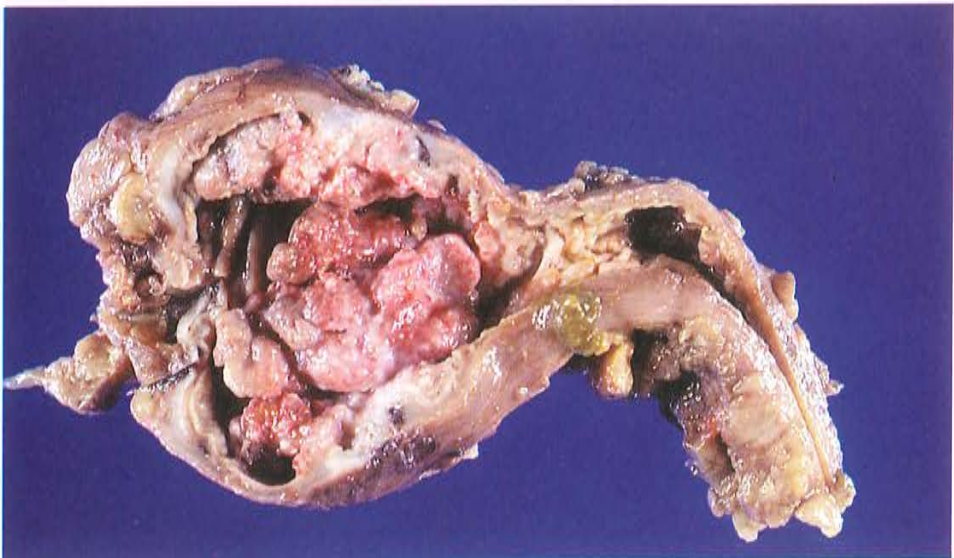


FIGURA 9. *Adenocarcinoma úlcero-vegetante.*



FIGURA 10. *Adenocarcinoma úlcero-vegetante.*

Estudio Microscópico

Por toma de biópsias de las lesiones localizadas por colonoscopia se obtienen estudios histopatológicos como estos que señalamos a continuación (figuras 11, 12, 13 y 14):

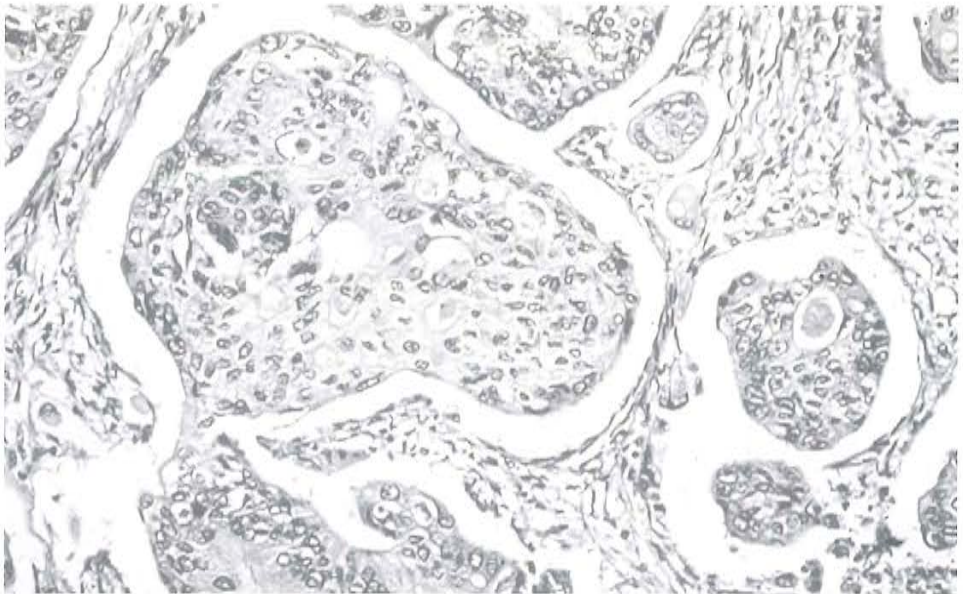


FIGURA 11. *Adenocarcinoma de baja diferenciación con nidos sólidos y células cúbicas. DUKES C.*

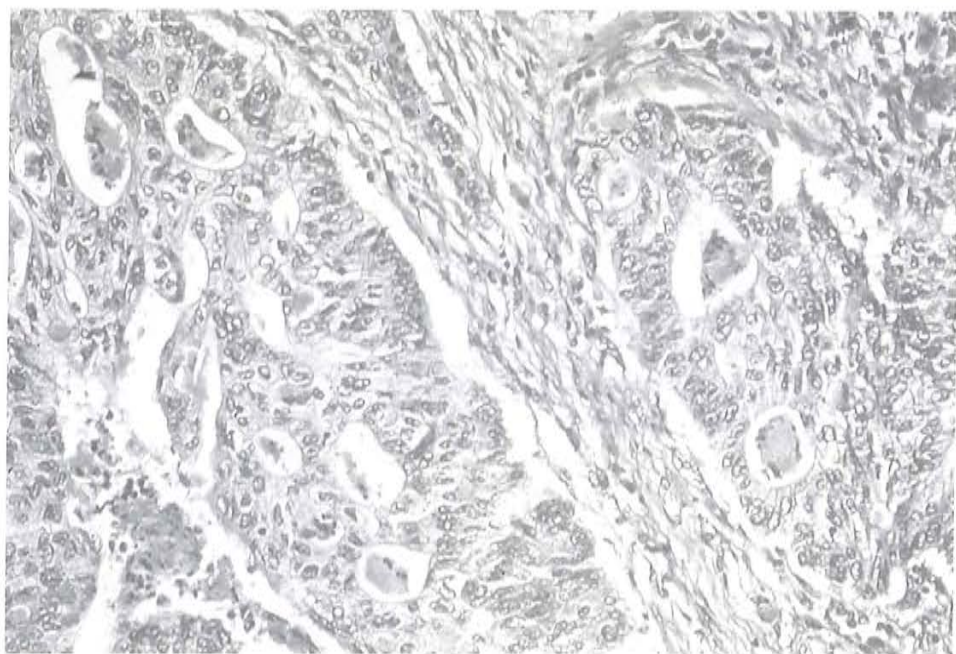


FIGURA 12. *Adenocarcinoma bien diferenciado con células cilíndricas.*

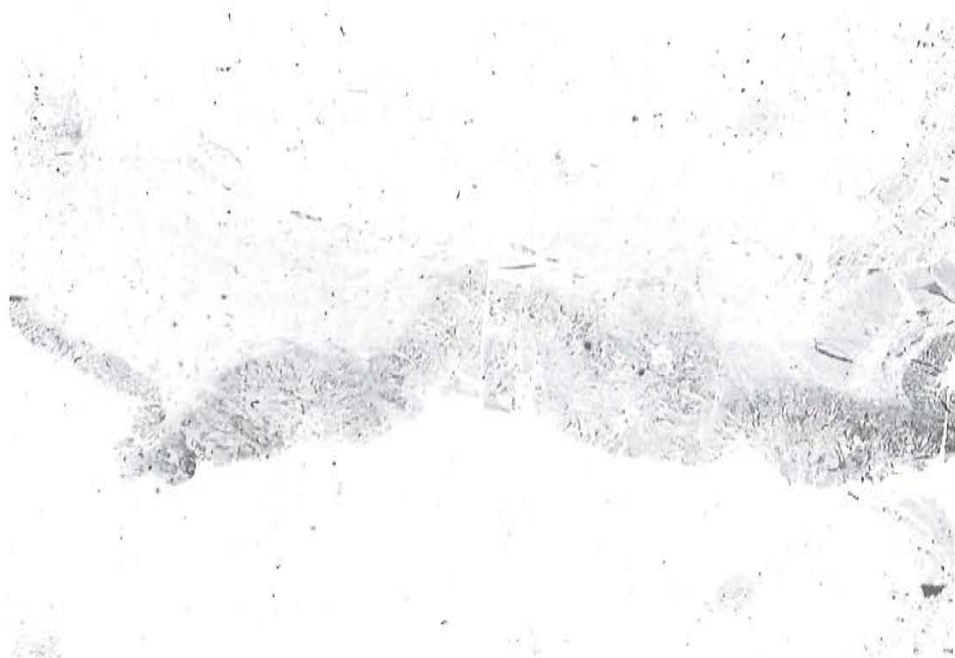


FIGURA 13. *Neoplasia que penetra hasta la muscular, sin rebasar la serosa. DUKES A.*

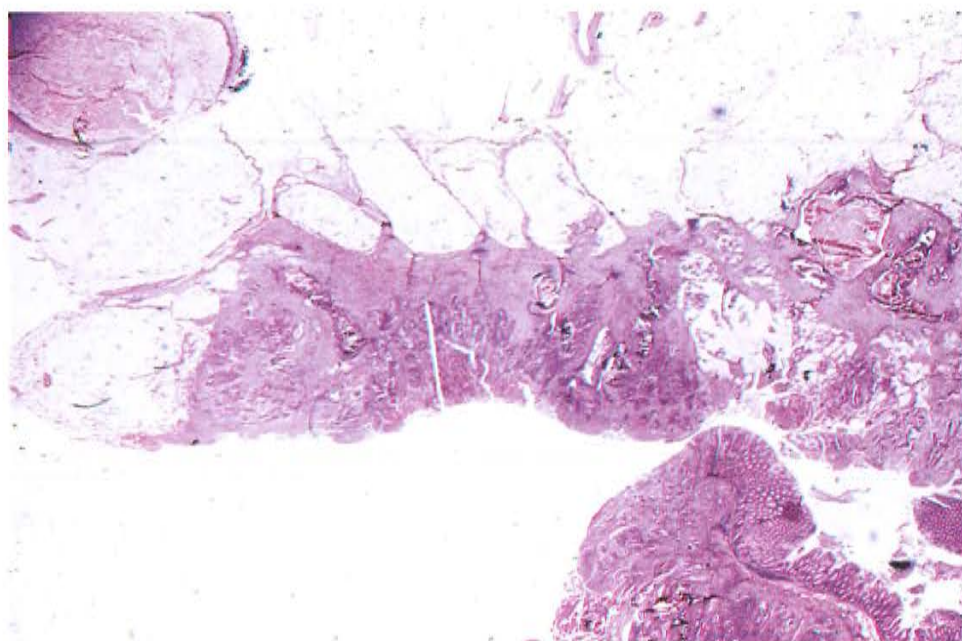


FIGURA 14. *Adenocarcinoma ulcerado. Penetra la serosa y afecta al ganglio local. DUKES C.*

La colonoscopia es de gran utilidad para detectar casos precoces, toma de biopsias, y también para estirpación de pólipos si se observan durante la observación. Es el método más fiable para el diagnóstico.

En campañas para detectar tumores de colon, se había generalizado la investigación de las hemorragias ocultas, de utilidad para descubrir casos iniciales, sin otra sintomatología clínica y sin hallazgos radiológicos ostensibles. Se hace por métodos de laboratorio y también con la colaboración del paciente con el sistema «hemocult», procedimiento que se inició en los Estados Unidos y países Centro Europeos y que ha caído en desuso.

TRATAMIENTO

El tratamiento de los tumores de colon y recto es quirúrgico, más eficaz cuanto más precoz es el diagnóstico. Es conveniente la resección del tracto donde esté el tumor y complemento con quimioterapia oncológica si procede.

Es importante la conveniencia del rastreo postoperatorio, con investigación del antígeno carcinoembrionario, CEA, que se emplea desde el año 1965 en que Gold y Fredman consiguieron un suero anticarcinoma. Se llama carcinoembrionario porque el antígeno estaría presente en el intestino embrionario y fetal de seis meses de gestación. Aumenta en la escala DUKES de A hasta D.

El CEA es útil como control en pacientes resecaos de cáncer de colon y tiene valor pronóstico. Se estiman como cifras normales hasta 5 nanogramos/ml.

Está en relación con el DNA celular. Si en los pacientes con carcinoma de colon, resecaados, aumentan los niveles de CEA, por encima de 5 ng/ml, es que existe recidiva y metástasis hepáticas sobre todo.

Es una técnica de rastreo que aún no está del todo bien definida, porque no es específica del carcinoma de colon. En todo caso debe hacerse siempre en el mismo laboratorio y con los mismos métodos, porque sino los resultados no serán fiables.

Los casos que nosotros tenemos en seguimiento empleando este radio inmunoensayo, nos han resultado orientadores para prever las recidivas y la presencia de metástasis hepáticas.

Hay estudios encaminados al tratamiento del cáncer de colon y recto, con medicamentos. Científicos españoles en abril de 1997, dirigidos por Faustino Mollinedo, de la Universidad de Valladolid e investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y otro grupo de investigadores del Hospital Valdecilla de Santander, que dirige Luis Fernández, y ambos en colaboración con el Instituto Max-Planck de Friburgo, han descubierto la primera droga que provoca el «suicidio» selectivo de células cancerosas, sin afectar a las sanas. Comunican que un compuesto farmacológico: ET.18.OCH3 —eter fosfolípido—, conocido como edelfosina, induce la muerte selectiva y rápida de células cancerosas, sin que las normales se vean alteradas.

Este descubrimiento que se publicó en la revista Cancer Research, abril de 1997, abre una puerta de esperanza en la búsqueda de fármacos selectivos, no tóxicos para células sanas, y destructivo para las tumorales. Popularmente reciben el nombre de «balas mágicas» o «bombas biológicas».

La edelfosina actúa induciendo la apoptosis celular de forma potente. Los estudios realizados demuestran que la droga produce interacción con una estructura molecular, probablemente una proteína presente en la célula cancerosa y ausente en las células normales.

El investigador de Valladolid, subrayó que la potente droga mencionada, se ha probado en células procedentes de médulas óseas de pacientes leucémicos y en células tumorales de enfermos con carcinoma de colon y en todos los casos se mostró «totalmente efectiva». El Dr. Mollinedo se mostró asombrado del carácter destructor tan selectivo de la droga que se sintetiza en Alemania. De todas formas también expresó el temor que el descubrimiento produjera falsas expectativas y recomendó paciencia porque «esto es un trabajo de laboratorio y su paso a la clínica, es largo y difícil».

Los trabajos actuales centran la atención de los investigadores, en identificar la proteína de las células tumorales con las que interacciona la droga. Parece ser que los estudios se encaminan por el gen p53 y su proteína ha sido aislada en el 60% de los tumores.

En tanto estos trabajos no cristalicen y se compruebe la eficacia de los fármacos experimentales, el tratamiento del cáncer de colon y recto es el quirúrgico, más eficaz cuanto más precoz es el diagnóstico, que podemos lograr si empleamos los procedimientos reseñados.

Lo importante es encontrar el tumor en la clasificación DUKES A o B, porque así el tratamiento quirúrgico será eficaz y la calidad de vida será buena.

Nuestra conducta nos permite contemplar los resultados con serenidad y satisfacción, como cuando vemos una obra de arte. Figura 15:



FIGURA 15. *Fachada de la catedral de Burgos.*

Los enfermos se pueden curar muchas veces, y otras, llevar una vida en condiciones muy aceptables, si se pueden hacer anastomosis termino-terminales que permiten el tránsito intestinal sin colostomía y sin bolsa, que tanto mortifican al enfermo.

MICOTOXINAS Y SU EFECTO INMUNOSUPRESOR SOBRE AVES

M. A. CALVO TORRAS* y M. AGUT BONSFILLS**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios elaborados y acumulados por hongos capaces de causar procesos de intoxicación principalmente sobre células eucariotas. Se caracterizan por ser termorresistentes y ello determina que las condiciones a las que se someten los piensos no sean adecuadas o suficientes para desnaturalizarlas cuando han sido vertidas al sustrato por el hongo productor, aunque éste haya sido eliminado (Calvo *et al.* 1993).

Podemos establecer varios grupos de micotoxinas, según sea su agente productor o su composición química. Atendiendo a esta última podemos diferenciar los grupos siguientes:

Grupo I: Derivados de quinonas y ácidos grasos.

Grupo II: Terpenoides y esteroides.

Grupo III: Nonadrina.

Grupo IV: Alcaloides y compuestos peptídicos.

Grupo V: Derivados del indol y de las cumarinas.

Grupo VI: Derivados de pironas, lactonas y lactamas.

Desde que en la década de los sesenta se descubrieron las aflatoxinas, son muchas las micotoxinas descritas, sin que la lista actual pueda considerarse en modo alguno exhaustiva ni cerrada, pero cabe mencionar que los principales géneros fúngicos implicados en la elaboración y acumulación de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys* y *Phythomyces* (Calvo *et al.* 1993).

Los factores que afectan la elaboración de las micotoxinas y concretamente de las aflatoxinas han sido ampliamente establecidos. Entre ellos, destacaremos fundamental-

* Departamento de Patología y de Producción Animales. Facultad de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona. (E-mail: mariangels.calvo@uab.es).

** Departamento de Química Analítica. Instituto Químico de Sarriá. Universitat Ramon Llull. Via Augusta 390, 08017 Barcelona. (E-mail: magut@iqs.url.es).

La susceptibilidad de los animales frente a las micotoxinas, varía con la especie, la edad, el sexo y las condiciones fisiológicas y metabólicas del individuo. Debe tenerse asimismo en consideración que aún cuando la micotoxina sea metabolizada fundamentalmente en el hígado, puede también acumularse y aún pasado cierto tiempo desde la ingestión de la micotoxina, puede transferirse a productos de secreción del individuo, entre los que destacan la leche y la orina. Asimismo se ha demostrado que las aflatoxinas y sus metabolitos pueden detectarse en sangre, orina, órganos y tejidos del cerdo y de las aves de corral, entre otros (Calvo *et al.* 1993). En el caso de las aves, la eliminación de micotoxinas puede realizarse a través del riñón y de la puesta.

A partir de diversos estudios, se ha podido evidenciar la relación entre el consumo de productos que contengan aflatoxinas y las modificaciones manifiestas en el sistema inmunitario del individuo afectado. Entre las alteraciones observadas podemos citar las que afectan a las fracciones proteicas en los diferentes órganos responsables de la inmunidad. Pier *et al.* (1973) observaron una disminución en el nivel de proteínas, fundamentalmente en las concentraciones de alfa y beta globulinas y en albúmina, mientras que los resultados obtenidos sobre la gamma-globulina no permiten establecer una clara relación entre la ingestión de aflatoxinas y el nivel de esta proteína. Giambrone *et al.* (1978) demostraron una disminución en la concentración de Ig G y de Ig A, tras el consumo de piensos contaminados por aflatoxinas, según estos autores, la ingestión de aflatoxinas, facilita la instauración de procesos de infección que consideran secundarios al consumo.

Se ha demostrado que una larga exposición a bajos niveles de aflatoxinas puede desencadenar en algunas especies animales, un descenso de su respuesta inmunológica frente a la invasión de determinados microorganismos patógenos con el consiguiente grado de peligrosidad para contraer la infección. Estas experiencias permiten deducir que aún en el supuesto de que los animales no mueran por una micotoxicosis, los animales afectados, tras la ingestión de micotoxinas, presentan un cuadro de inmunosupresión.

Michael *et al.* (1973) estudiaron la influencia que podía tener la ingesta de aflatoxinas sobre el sistema reticuloendotelial en aves. Sus resultados permitieron deducir que la susceptibilidad a las infecciones aumentaba en estos animales ya que el mecanismo de destrucción de agentes exógenos se encontraba disminuído en la circulación sanguínea, no pudiendo procesar en ocasiones los componentes antigénicos para poder desarrollar una respuesta inmunológica adecuada.

Mohiuddin *et al.* (1986) detectaron en pollitos intoxicados con micotoxinas una disminución en la capacidad fagocitaria de las células de Kupffer y de los heterófilos, aunque estos últimos estaban proporcionalmente incrementados.

Giambrone *et al.* (1978) observaron una inmunosupresión en aves coincidiendo con la administración de aflatoxina B1 que quedaba regularizada al suprimir la micotoxina de la dieta por lo que apuntaron que se trataba de una inmunosupresión temporal. Detectaron una inmunidad celular deficiente que coincidía con los datos aportados por Chang *et al.* dos años antes. Estos últimos autores demostraron la inhibición de la capacidad quimiotáctica de los leucocitos y de la capacidad fagocitaria de los heterófilos. Contrariamente a estas afirmaciones, Campbell *et al.* (1983) no hallaron ninguna relación entre la administración de aflatoxinas y la modificación de la capacidad fago-

citaria de los heterófilos. Estos resultados contradictorios pueden ser debidos a que utilizaban dosis bajas de aflatoxinas que eran administradas durante períodos de tiempo muy cortos. Giambrone *et al.* (1985a, 1985b, 1985c) detectaron una disminución en la inmunidad celular de pollos y pavos tratados con aflatoxina B1, concretamente una disminución en la población de linfocitos T que se agudizaba al administrar conjuntamente aflatoxinas B1 y B2.

Los estudios de Pier *et al.* (1973) demuestran que las aflatoxinas disminuyen la producción de interferón y reducen la actividad del complemento. Stewart *et al.* (1985) confirmaron estos datos detectando una disminución en la actividad global del complemento, hallazgo también descrito con anterioridad por Campbell *et al.* (1983), quienes consideraron que esta disminución era una de las respuestas más significativas del sistema inmunitario frente a las micotoxicosis y en particular a las aflatoxicosis. Asimismo la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares, se ve reducida cuando los animales han recibido dosis elevadas de aflatoxinas y presentan concentraciones de las mismas detectables en sangre.

Las aflatoxinas ejercen por lo tanto un efecto sobre la respuesta inmunológica, al menos en parte a través del timo y de los linfocitos. Se observa también una significativa diferencia y reducción de la hipersensibilidad cutánea.

Asimismo, es de gran interés el efecto que en las aves, pueden ejercer las micotoxinas fundamentalmente sobre los órganos inductores de inmunidad, es decir, sobre el timo y la bolsa de Fabricio, pues su involución puede ser causa de inmunosupresión que facilitará la complicación del cuadro de intoxicación con la instauración de otros procesos patológicos secundarios. Así por ejemplo, ya en 1973 Newberne publicó que una ingesta diaria de dosis bajas de aflatoxinas en pavos, disminuía su resistencia a cepas de *Salmonella*. También Chang y Hamilton (1982) señalaron que las aves que padecían la enfermedad bursal infecciosa presentaban un agravamiento del cuadro clínico e incluso la aparición de síntomas atípicos cuando concomitantemente eran diagnosticadas de aflatoxicosis. Podemos destacar, sin embargo, que Giambrone *et al.* en 1985 demostraron que la ingestión de aflatoxinas no incrementaba la susceptibilidad de las aves de padecer la enfermedad de Newcastle. Asimismo, Richard *et al.* en 1973, ya evidenciaron que en aves expuestas a la ingestión de aflatoxinas no se presentaba mayor incidencia de aspergilosis por *Aspergillus fumigatus* que en los controles.

Okeye y Okeke (1986) indicaron una deplección de linfocitos a nivel de la bolsa de Fabricio y del bazo.

Al estudiar la influencia de las micotoxinas sobre el sistema inmunitario de los pavos, Pier *et al.* en el año 1971 observaron una alteración del peso del timo en relación con el peso vivo del animal intoxicado que se manifestaba también por una involución histológica del mismo deduciéndose de ello que las aflatoxinas ejercían un efecto directo sobre el sistema inmunogénico de estos animales. Posteriormente, en 1977 estos mismos autores comprobaron los efectos de la mencionada involución pero sin detectar una alteración en la bolsa de Fabricio. Raina y Singh (1991) exponen que las alteraciones sobre la bolsa de Fabricio dependen de la micotoxina ingerida, pero que en general se acompañan de modificaciones de las células linfoides que pueden ser observadas también en la bolsa de Fabricio.

En pollos, Thaxton *et al.* en el año 1974 y Ubosi *et al.* en 1985 determinaron que tras el consumo de aflatoxinas, las aves intoxicadas presentaban una disminución del peso relativo del hígado, de la bolsa de Fabricio y del timo, aunque para ello las dosis administradas eran relativamente elevadas. Sin embargo, estos últimos autores no detectaron ninguna pérdida de peso del bazo.

Thaxton *et al.* (1974) aportaron la relación directa entre la concentración de aflatoxina ingerida y el grado de inmunosupresión que presentaban los pollos en los primeros días de vida. En contraposición con estos datos, Giambrone *et al.* en 1985 no detectaron ningún tipo de alteración ni en el timo ni en la bolsa de Fabricio de individuos sometidos a aflatoxina B1. Una posible explicación de estos resultados contradictorios podemos encontrarla en la diferente metodología utilizada, así como en la estirpe genética y edad de los animales y en la duración del proceso de intoxicación.

Harvey *et al.* (1991) citan que las modificaciones sobre el sistema inmunitario pueden observarse tanto a nivel de la inmunidad celular como de la inmunidad humoral.

Las aflatoxinas causan una reducción de la función de las células T, disminuyen la respuesta de los anticuerpos, así como la actividad fagocitaria (Miller, 1991). De forma similar, las ocratoxinas modulan varios aspectos de la respuesta inmune tanto a nivel celular como humoral. La exposición a las ocratoxinas induce la actividad de las células «natural killer» y suprime la respuesta de los anticuerpos (Pestka y Bondy, 1990). Las toxinas de *Fusarium* inhiben la producción y función de los macrófagos. Los animales expuestos a tricotecenos muestran un incremento de su susceptibilidad a procesos fúngicos como la criptococosis y la candidiasis, y también a toxiinfecciones ocasionadas por *Listeria* y *Salmonella*. Los tricotecenos afectan a las células B y T, así como a la función de los macrófagos, siendo capaces de desencadenar una desregulación de la inmunoglobulina A. Mekhancha-Dahel *et al.* (1990) demostraron que la presencia de la toxina T-2, deoxinivalenol (DON) y de la diacetoxiscirpenol (DAS) en alimentos a concentraciones que se encuentran en condiciones naturales pueden ser recuperadas en sueros en concentraciones suficientes para ser causa de inmunosupresión.

Dietert *et al.* (1985) detectaron modificaciones en las respuestas de inmunidad congénita, demostrando que la exposición de embriones a aflatoxina B1 podía inducir un proceso de inmunosupresión más acentuado a nivel de la inmunidad celular, detectando una disminución de la población de linfocitos T. El alcance de esta investigación radica en que demuestra que individuos en los que ya no persisten micotoxinas puede establecerse un estado de inmunodeficiencia.

Finalmente, cabe mencionar que para que se produzcan interferencias de las micotoxinas con la inmunidad adquirida, éstas deben ser administradas o consumidas durante o después de un período de inmunización activa frente a un determinado proceso.

En vista de los datos expuestos se evidencia la gran influencia que ejercen las micotoxinas sobre el sistema inmunitario de las aves con la consiguiente repercusión económica pues la ingesta de micotoxinas se traduce en una disminución de la respuesta inmunitaria. Por ello, es necesario avanzar en el estudio de estos metabolitos indeseables, para evitar su producción y acumulación en los piensos y sus efectos perjudiciales sobre las aves que los ingieren.

BIBLIOGRAFIA

- CALVO M.A., AGUT M., CALVO R.M. y J. LARRONDO. 1993. Los hongos: agentes etiológicos en procesos patológicos en el hombre y los animales. *Rev. Real Acad. Med. Cat.* **8** (2): 81-8.
- CAMPBELL M.L., MAY J.D., HUFF W.E. y J.A. DOERR. 1983. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Sci.* **62**: 2138-2144.
- CHANG C.F. y P.B. HAMILTON. 1976. Impairment of leukocyte chemotaxis and phagocytosis during aflatoxicosis. *Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 181.
- CHANG C.F. y P.B. HAMILTON. 1982. Increased severity and new symptoms of infectious bursal disease during aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* **61**: 1061-1068.
- DIETERT R.R., QURESHI, M.A., NANNA U.C. y S.E. BLOOM. 1985. Embryonic exposure to aflatoxin-B1: mutagenicity and influence on development and immunity. *Environ. mutagen.* **7**: 715-725.
- GIAMBRONE J.J., DIENER U.L., DAVIS N.D., PANANGALA V.S. y F.J. HOERR. 1985a. Effect of purified aflatoxin on broiler chickens. *Poultry Sci.* **64**: 852-858.
- GIAMBRONE J.J., DIENER U.L., DAVIS N.D., PANANGALA V.S. y F.J. HOERR. 1985b. Effect of purified aflatoxin on turkeys. *Poultry Sci.* **64**: 859-865.
- GIAMBRONE J.J., DIENER U.L., DAVIS N.D., PANANGALA V.S. y F.J. HOERR. 1985c. Effect of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. *Poultry Sci.* **64**: 1678-1684.
- GIAMBRONE J.J., EWERT D.L., WIATT R.D. y C.S. EIDSOM. 1978. Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immuno systems of chicken. *Am. J. Vet. Res.* **39**: 305-308.
- HARVEY R.B., KUBENA L.F., HUFF W.E., ELISSALDE M.H. y T.D. PHILIPPS. 1991. Haematologic and immunologic toxicity of deoxynivalenol (DON) contaminated diets to growing chickens. *Bull. Environ. contam. toxicol.* **46** (3): 410-416.
- HUFF W.E., KUBENA L.F., HARVEY R.B. y J.A. DOERR. 1988. Mycotoxin interactions in poultry and swine. *J. Anim. Sci.* **66** (9): 2351-2355.
- MEKHANCHA-DAHEL C., LAFARGE-FRAYSSINET C. y C. FRAYSSINET. 1990. Immunosuppressive effects of four trichothecenes. *Food Add. Cont.* **7** (Supp.): 94-96.
- MICHAEL G.Y., THAXTON P. y P.B. HAMILTON. 1973. Impairment of the reticuloendothelial system of chickens during aflatoxicosis. *Poultry Sci.* **52**: 1206-1207.
- MILLER J.D. 1991. Significance of grain mycotoxins for health and nutrition. *ACIAR Proc.* **36**: 126-135.
- MOHIUDDIN S.M., REDDY M.V., REDDY M.M. y K. RAMAKRISHNA. 1986. Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflatoxicosis in poultry. *Ind. Vet. J.* **63**: 442-445.
- NEWBERNE P.M. 1973. Chronic aflatoxicosis. *J.A.V.M.A.* **163**: 1262-1267.
- OKOYE J.O.A. y C.N. OKEKE. 1986. Pathogenicity of an isolate of *Aspergillus flavus* in chickens. *Avian Pathol.* **15**: 259-270.
- PESTKA J.J. y G.S. BONDY. 1990. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Phys. Pharmac.* **68**: 1009-1016.
- PIER A.C. 1973. Effects of aflatoxin on immunity. *J.A.V.M.A.* **163**: 1268-1269.
- PIER A.C., FICHTNER R.E. y S.J. CYSEWSKI. 1977. Effects of aflatoxin on the cellular immune system. *Ann. Nutr. Alim.* **31**: 781-788.

- PIER A.C., HEDDLESTON K.L., CYSEWSKI S.J. y J.M. PATTERSON. 1971. Effect of aflatoxin on immunity in turkeys. II. Reversal of impaired resistance to bacterial infection by passive transfer of plasma. *Avian Dis.* **15**: 381-387.
- RAINA J.S. y B. SINGH. 1991. Prevalence and pathology of mycotoxicosis in poultry in Punjab. *Ind. J. Anim. Sci.* **61** (7): 671-676.
- RICHARD J.L., PIER A.C., CYSEWSKI S.J. y C.K. GRAHAM. 1973. Effect of aflatoxin and aspergilosis on turkey poults. *Avian Dis.* **17**: 111-121.
- STEWART R.G., SKEELES J.K., WYATT R.D., BROWN J., PAGE R.K., RUSSELL I.D. y P.D. LUKERT. 1985. The effect of aflatoxin on complement activity in broiler chickens. *Poultry Sci.* **64**: 616-619.
- THAXTON J.P., TUNG H.T. y P.B. HAMILTON. 1974. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Poultry Sci.* **53**: 721-725.
- UBOSI C.O., GROSS W.B., HAMILTON P.B., EHRICH M. y P.B. SIEGEL. 1985. Aflatoxin effects in white leghorn chicks selected for response to sheep erythrocyte antigen. 2. Serological and organ characteristics. *Poultry Sci.* **64**: 1071-1076.

LAS AGUAS MINERALES DE GALICIA*

ANTONIO RAMÍREZ ORTEGA, M. ESPERANZA RIAL LEMOS
y JAVIER-ÁNGEL RAMÍREZ MASFERRER

INTRODUCCIÓN

Las aguas naturales nunca son puras, todas tienen disueltas en mayor o menor proporción sales, gases y algunos compuestos orgánicos. La variedad y la cantidad en esos diversos componentes son los que determinan sus características no sólo físicas y químicas, sino también sus propiedades medicinales.

Según el BOE de la Comunidad de Galicia, la Ley 5/1.995 de 7 de Junio, las *aguas minerales* se clasifican en

- a) minero-medicinales, cuando por sus características y cualidades sean declaradas de utilidad pública y sean aptas para tratamientos terapéuticos.
- b) minero-industriales, las que permiten el aprovechamiento racional de las sustancias que contengan.
- c) minerales naturales, aquellas que sean bacteriológicamente sanas de origen subterráneo y que broten de un alumbramiento natural o manantial o de una perforación o pozo, caracterizadas por su contenido en minerales, oligoelementos y en ocasiones determinados efectos favorables.

Las termales aquellas cuya temperatura de surgencia sea superior, al menos, en cuatro grados centígrados a la media anual del lugar en que alumbren.

Aguas de manantial aquellas de origen subterráneo que emergen espontáneamente en la superficie de la tierra o se captan mediante labores practicadas al efecto, con las características naturales de pureza que permiten su consumo.

En Galicia existen aguas minero-medicinales y aguas minerales naturales. Entre las primeras hay un gran número de termales, que se aprovechan actualmente en 14 balnearios activos con baños y otras completas instalaciones para vía tópica con fines terapéuticos, como duchas, chorros, pulverizaciones, inhalaciones, etc., además hay 3, en los que sus aguas se usan sólo por vía oral y otros 6 son sólo casas de baños.

* Conferencia pronunciada el 19 de mayo de 1999.

También, hay 5 balnearios en construcción o en proyecto y 18 antiguos casas de baños actualmente sin uso. Las segundas se explotan en 10 plantas de envasado y están en proyecto 3 más.

Además, están inventariados 234 manantiales, siendo 20 de ellos muy interesantes para posibles aprovechamientos en unos casos como balnearios y en otros para bebida de mesa.

ORIGEN DE LAS AGUAS MINERALES Y TERMALES

Según su origen se distinguen tres tipos las meteóricas o exógenas; las juveniles o endógenas y las fósiles o congénitas.

1. Las meteóricas son aguas de precipitación que se infiltran a más o menos profundidad, adquiriendo así una temperatura, que depende del nivel alcanzado en el subsuelo y de su correspondiente gradiente geotérmico. En ese recorrido subterráneo las aguas pueden mineralizarse al reaccionar y disolver los diferentes materiales rocosos atravesados, saliendo después a la superficie en las surgencias o manantiales (Fig. 1).

La circulación de las aguas infiltradas se realiza generalmente a favor de grandes fracturas, que penetran en el subsuelo por simple efecto de la gravedad. En su descenso experimentan un continuo aumento de su temperatura y una mayor presión debido a la columna de la propia agua que tiene encima. Esta elevada temperatura y fuerte presión favorece los procesos químicos de descomposición y posterior disolución de los componentes de las rocas con las que está en contacto el agua, adquiriendo una significativa mineralización.

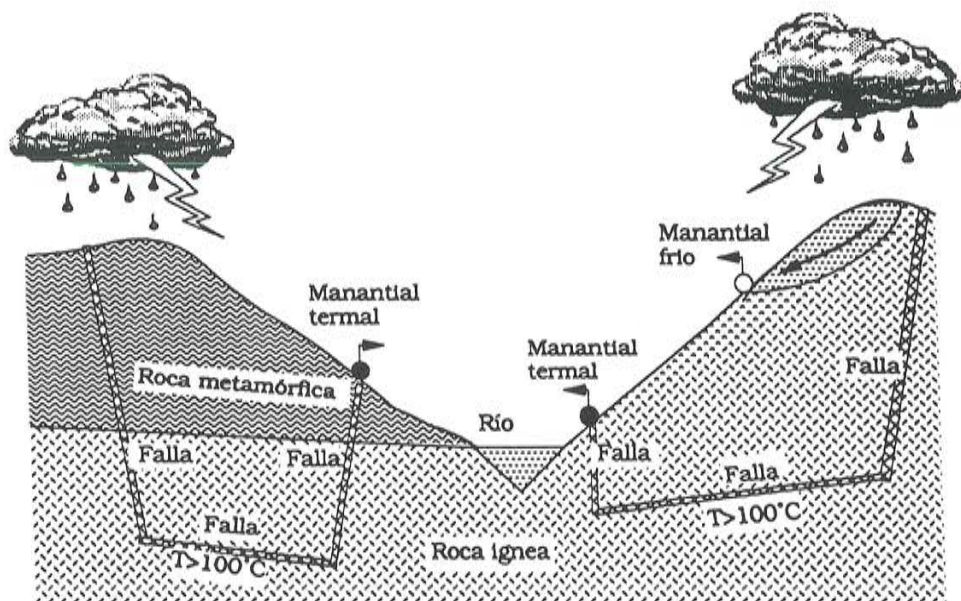


FIGURA 1. Áreas de emergencia hidrotermal.

En la composición de las aguas subterráneas destacan elementos disueltos en forma de iones, principalmente sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, litio, manganeso, flúor, cloruro, sulfuro, sulfato, nitrato, etc. y otros en forma no-iónica, como el ácido silícico, cuando el pH del ambiente es inferior a 9. Este último es indicador de la temperatura alcanzada donde se descompusieron los minerales que tienen esa agua. También se incorporan al agua gases, principalmente carbónico y sulfhídrico, nitrógeno, metano, etc., procedentes de la atmósfera o de reacciones bioquímicas.

El flujo descendente del agua subterránea infiltrada en el área de recarga se dirige hacia arriba en el área de descarga. Este último tramo de su recorrido se favorece en parte por el peso de la columna fría descendente, que produce un efecto de termosifón, y por otro lado por el efecto expansivo de los vapores y gases, formados y adquiridos en su recorrido subterráneo. La recarga se encuentra en las cumbres topográficas y la descarga en las depresiones adyacentes, generalmente en las márgenes de los ríos o incluso en sus cauces. Esquemáticamente, el circuito de un agua termomineral exógena es similar a unos vasos comunicantes con uno de los tubos más corto que el otro.

Los componentes mineralógicos de las rocas se descomponen por los procesos de meteorización química, debido principalmente a las aguas superficiales e infiltradas, al ácido carbónico, al oxígeno y a la materia orgánica, y actualmente en algunas zonas a las lluvias ácidas, que entrando en contacto con la superficie de las rocas, dan lugar a reacciones de hidrólisis, disolución, carbonatación, oxidación-reducción y quelatación.

Las rocas ígneas más ácidas (granitos) y por lo tanto más ricas en feldespatos alcalinos, dan lugar a aguas bicarbonatadas sódicas. Las intermedias (sienitas, granodioritas y dioritas) producen aguas bicarbonatadas cálcicas y las básicas (gabros y peridotitas) originan aguas bicarbonatadas cálcico-magnésicas ricas en hierro.

La temperatura de emergencia del agua termal dependerá no sólo de la profundidad alcanzada; sino también de la velocidad de ascenso y de la posible mezcla con las aguas frías superficiales.

Cuando las aguas subterráneas circulan por terrenos compuestos por rocas metamórficas esquistosas fracturadas en superficie y ricas en pirita, suelen ser sulfatadas ferruginosas (Fig. 2). Estas muestran en sus afloramientos costras de color rojizo de oxi-hidróxido férrico, producido al oxidarse el ion ferroso en el contacto con el aire.

La circulación subterránea supuesta anteriormente está canalizada dentro de fracturas más o menos verticales en terrenos de rocas ígneas o metamórficas, pues sólo así son permeables, y también por la fragmentación que puede producirse debido a la meteorización física de las rocas. No obstante, también existen en profundidad rocas que tienen permeabilidad intergranular. Estas son rocas sedimentarias, que se presentan en capas confinadas entre otras rocas no porosas, desplazándose en ellas las aguas horizontalmente, pudiendo salir al exterior a través de una falla que corte todas esas formaciones o alumbrarse por medio de pozos o sondeos (Fig. 3).

Este último tipo de aguas, que también suelen ser termales y muy mineralizadas, se encuentran en las depresiones o fosas rellenas de un gran espesor de sedimentos, como las cuencas del Duero o Tajo, donde existen capas alternantes de arenas, limos,

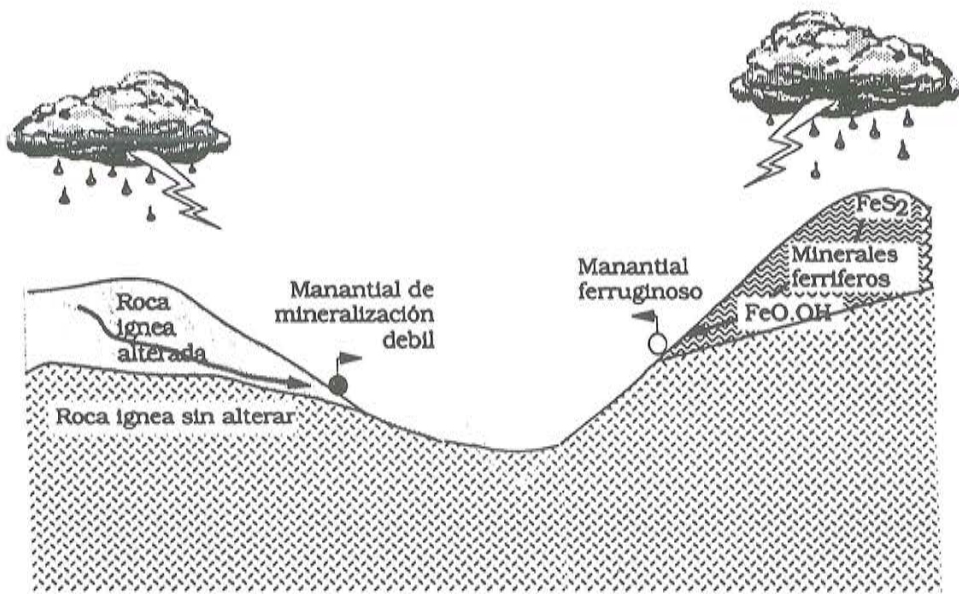


FIGURA 2. Manantiales de mineralización débil y ferruginoso.

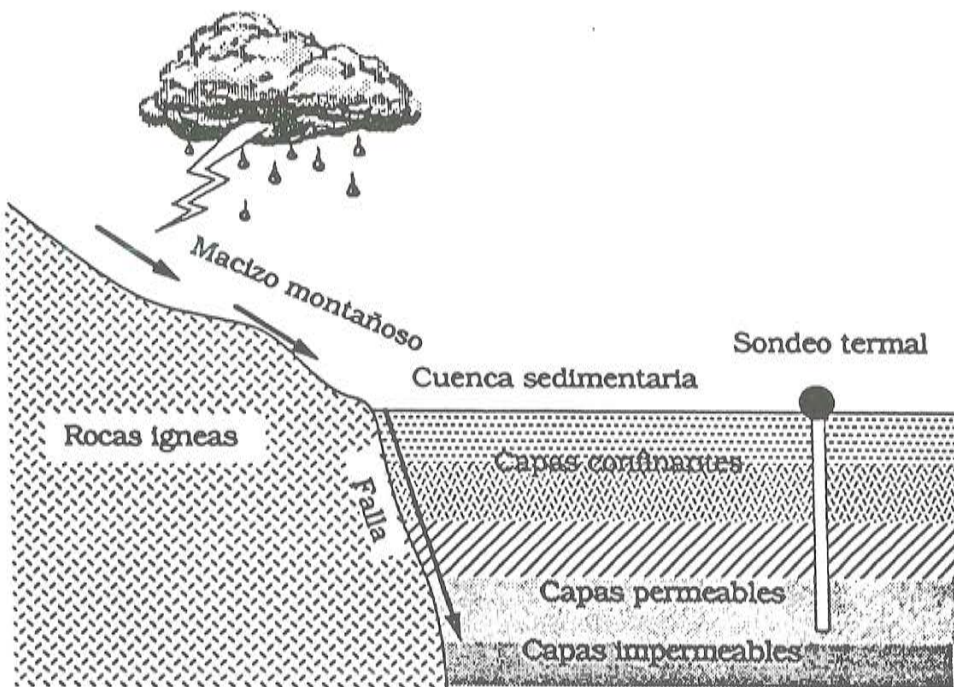


FIGURA 3. Cuenca hidrotermal.

arcillas y algunos niveles calcáreos o evaporíticos profundos. Estas aguas generalmente son cloruro-sulfatadas sódico-cálcicas y a veces magnésicas.

En otros casos las aguas recorren un macizo calcáreo, en el que se forman conductos, más o menos grandes, incluso cuevas por las que circulan verdaderos ríos, causados por la disolución que producen de las aguas ricas en anhídrido carbónico, que combinado con el agua de infiltración forma ácido carbónico, que es un buen reactivo de descomposición de los minerales de cualquier tipo de roca. La procedencia más importante de ese ácido se debe a la materia orgánica de las plantas en descomposición, que se acumula en la franja superficial del suelo de los climas húmedos y templados. Estas aguas son bicarbonatadas cálcicas de mineralización media, a veces ricas en magnesio si atraviesan rocas dolomíticas (Fig. 4).

2. Las juveniles se suponen originadas a gran profundidad por síntesis o deshidratación, al producirse la cristalización de un magma en rocas plutónicas o volcánicas. En este proceso se desprenden gran cantidad de gases, como carbónico, sulfuroso, sulfhídrico, amoníaco, hidrógeno e incluso metano; aunque estos mismos también se encuentran en las aguas termales de origen meteórico.

3. Las fósiles son aguas atrapadas en las formaciones sedimentarias por los detritos depositados en las cuencas marinas profundas. Lógicamente son aguas salobres y a veces acompañan a los fluidos de hidrocarburos encontrados en las rocas-almacén, denominándose en este caso «aguas de formación».

Dadas sus condiciones especiales de génesis y emigración no es muy corriente su hallazgo; sino que suele encontrarse en los sondeos de investigación petrolífera, en terrenos muy permeables, donde además existen trampas que no permiten salir a la superficie el agua, ni el petróleo o gas acompañante.

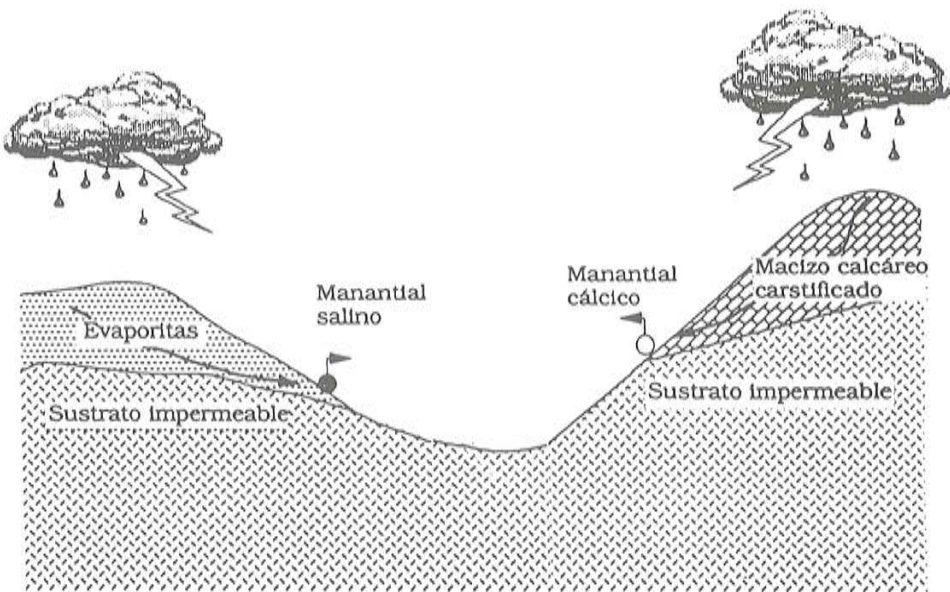


FIGURA 4. Manantiales: salino y cálcico.

Generalmente son aguas cloruro-sulfuradas y su temperatura depende de la profundidad en la que se encuentre.

En Galicia sólo se encuentran aguas del primer tipo, es decir, meteóricas; pero con casi todas sus variedades desde aguas termales muy mineralizadas (Fig.1) hasta aguas frías de temperaturas menores de 10 °C y muy débil mineralización (Fig.2), que aparecen en los manantiales de las montañas o en los pozos caseros. Junto con aguas ferruginosas, principalmente en terrenos pizarrosos, como los de la Serra do Courel, O Incio, Viveiro y otras.

En la franja que recorre Galicia Oriental de Norte a Sur, donde existen niveles calcáreos surgen aguas frías bicarbonatadas cálcicas como las de Pacios, Valdefariña, Cova das Choias y Veiga do Foxo, y en algunos caso como en la mina de Magnesitas de Rubián son ricas en magnesio (Fig. 4).

En cuanto a las aguas medicinales termales existe en Galicia una gran diversidad de temperaturas y composiciones químicas. Así tenemos las aguas moderadamente tibias sulfurado-bicarbonatadas cálcicas de Guitiriz y Pardiñas con temperaturas de 15 °C y 13 °C respectivamente; las tibias de Brea con 21 °C, sulfurado-bicarbonatada sódica de Rañoa con 20 °C; las moderadamente tibias sulfurado-bicarbonatadas sódico-cálcica de los Baños Vellos de Carballo y de Carballiño con las respectivas temperaturas de 37 °C y 26 °C. Las calientes sulfurado-bicarbonatadas sódicas de Molgas, con una temperatura de 40 °C y la cloruro-bicarbonatada de Caldelas de Tui de la misma temperatura. Entre las muy calientes están las bicarbonatadas sódicas de las Burgas de Ourense con 67 °C, las de las Termas de Lugo y Cuntis que son sulfurado-bicarbonatadas sódicas con 44 °C y 56 °C respectivamente y las cloruro-bicarbonatadas sódicas de A Toxa, Arteixo y Loureda con las temperaturas de 41 °C, 37 °C y 57 °C.

BALNEARIOS, CASAS DE BAÑOS Y MANANTIALES DE GALICIA

Lugo

En la provincia de Lugo existe un gran número de manantiales, que surgen tanto en los valles como en las sierras, con una gran variedad de composición en sus aguas, debido a la diversidad de las rocas que componen sus terrenos, pues existen granitos y granodioritas, neises, esquistos, pizarras y además cuarcitas y calizas. Entre sus aguas destacan las termales de las Termas de Lugo, las bicarbonatadas cálcicas de Fonxesta, las sódicas de Fontecelta y las magnésicas de Rubián, las ferruginosas de O Incio y la Sierra do Courel y las de muy débil mineralización de la misma sierra y de los Ancares.

Las aguas más importantes son los siguientes:

Fonte do Cebreiro

Esta fuente es la primera que se encuentra al entrar en Galicia en el camino francés Santiago. Su agua es de muy baja mineralización y su temperatura de 5 °C, por lo que es muy apropiada como bebida para los peregrinos, que transitan por allí, antes de llegar al pueblo del Cebreiro, donde encuentran albergue, y donde está la iglesia que

tiene, en un relicario que donaron los Reyes Católicos, el cáliz del milagro del Santo Grial Gallego, que figura en el escudo de Galicia, y la imagen de Santa María la Real, patrona del lugar.

Fonxesta

Esta planta envasadora de agua mineral natural se encuentra en el Km 482 de la carretera N-VI, dentro del término de Láncara. Sus aguas proceden de dos sondeos y son bicarbonatadas cálcicas de débil mineralización, por lo que son apropiadas como bebida de mesa, a la vez que son diuréticas y por lo tanto recomendables para la eliminación de cálculos renales.

Termas de Lugo

Este balneario conserva restos romanos del siglo I, con su «Apodyterium» (vestuario) y «Frigidarium» (Baños fríos, después capilla cristiana). Su situación está en las afueras de Lugo, a unos 900 m del centro de la ciudad que fue fundada por Paulo Fabio Máximo el año 14 a.J.C. y hecha capital de la Galicia Romana. Su primitivo nombre de «Lucus Augusti» (Luc=Bosque Sagrado) se debe a que Augusto César fue el que la hizo tribunal del convento jurídico de Galicia, con residencia de un gobernador y con una muralla de 2.200 m y 79 torres, que se comenzó a construir en el año 270.

El edificio del Hotel, situado a orilla del río Miño tiene 150 años, es reformado cada año desde 1.984. Sus aguas son de mineralización media, sulfurado-bicarbonatadas sódicas con 44 °C de temperatura y tienen aplicaciones tópicas para reumatismo, atrofas musculares, ciáticas, piel y vías respiratorias. En ingestión son recomendadas para el tratamiento de enfermedades hepáticas, del aparato digestivo, del riñón y de las vías biliares.

Las instalaciones balnearias de duchas, baños con hidromasaje, baños de burbujas, duchas circulares, parafangos, inhalaciones, duchas nasales, pulverizaciones y piscina de rehabilitación, son de las más modernas. El hotel, situado a 900 m del centro de la ciudad de Lugo, tiene además de las instalaciones balneoterapéuticas una capilla, un amplio y bonito jardín, y la posibilidad de pasear en barcas de remos por el río.

Balneario de Pardiñas-Fonte de San Domingos

Situado en el término de Guitiriz, ciudad que se encuentra en el Km 548 de la N-VI. El edificio donde está la fuente, se construyó en 1.955. Su grifo en forma de pez fue hecho por el insigne escultor M. Mallo, que está actualmente construyendo en su taller de O Carral de Begonte, con granito de su cantera de Parga las columnas para terminar la iglesia de la Sagrada Familia de Barcelona, según los planos de Gaudí. Su agua es sulfurado-bicarbonatada-clorurada sódica de 13 °C, y se utiliza sólo como bebida para tratamiento de enfermedades del hígado, bilis y riñón. La finca tiene una capilla y 10 apartamentos para estancia vacacional.

Balneario de Guitiriz-Fonte de San Xoan de Llagostelle

Situado en las afueras de la misma ciudad. Su hotel cerrado desde 1.972 fue construido a principios de siglo, dentro de una finca de 45 Ha en la que existe un maravilloso bosque con una tupida arboleda, dentro del cual se construyó una mezquita, pues el balneario estuvo habilitado durante la Guerra Civil como hospital para los combatientes del Tercio. En un edificio aparte está la fuente y una capilla. Sus aguas sólo se usan actualmente como bebida, siendo su composición y aplicaciones las mismas que las del anterior fuente y su temperatura es de 15 °C.

Fontecelta

En Céltigos del municipio de Sárria existió un balneario de aguas bicarbonatadas sódicas de media mineralización, con una temperatura de 21 °C, que surgen en una zona granítica cubierta por un cuaternario. Hoy en día en la misma finca existe una planta envasadora de aguas minerales naturales que extrae el agua de unos sondeos con la misma composición que las que se utilizaron en ese balneario para baños y bebida. Estas aguas están indicadas en los procesos dispépticos, hiposecretorios, en enfermedades hepáticas, procesos metabólicos relacionados con hiperglucemia o hipopuremia, litiasis renal y biliar. Estas aguas de gran calidad están comercializadas como agua mineral-natural y distribuidas por toda España.

Magnesitas de Rubian

En el término de O Incio, localidad de Vilademouros, existe una explotación de magnesita, que una vez calcinada se emplea como abono, corrector de acidez de suelos y aditivo de piensos. Dentro de la mina, actualmente subterráneas, existen varias surgencias debidas a la circulación de las aguas de infiltración, a través primeramente de zonas falladas en pizarras, de la formación Cándana, y después de potentes capas carstificadas de magnesitas, intercaladas en la misma formación. Sus aguas son bicarbonatadas cálcico-magnésicas de débil mineralización, por lo que pueden tener un buen uso como agua mineral natural envasada. Además tienen una alta proporción en magnesio, que le da unas cualidades medicinales muy específicas, por proporcionar un incremento potencial a las células; especialmente, en los períodos de la vida: embarazo y lactancia, crecimiento, edad escolar, pubertad y en edad senil, ya que también tiene efectos antienvjecimientos y anticancerígenos.

Balneario do Incio

Este balneario tiene un edificio construido en 1.892, en Ferrería do Incio, donde ya existía un palacio desde 1.630. Sus aguas ferruginosas bicarbonatadas cálcicas, manan a unos 2 Km, en una fuente situada fuera del pueblo de Ferrería, término de O Incio, estando recomendada para los casos de anemia con hiposiderosis, en estados asténicos, convalecencias y en trastornos de la infancia. Actualmente su hotel se encuentra en reconstrucción y está en proyecto su reapertura. En esta zona como en otras en las manan aguas ferruginosas existen mineralizaciones ferríferas, que en muchos casos se explotaron en el siglo pasado.

Serra do Courel

Esta sierra se extiende desde Vega de Valcarce en León hasta Quiroga en Lugo, con una dirección de Nordeste a Suroeste y un recorrido de unos 30 Km. En ella existen altas cumbres, como el Pio Páxaro con 1.616 m, Faro 1.621 m y Capeloso 1.603 ms.n.m. En sus montañas existen una gran cantidad de manantiales con una considerable diversidad en su composición mineral, dando lugar a importantes ríos como el Lor, Soldón, Gestoso y Selmo, todos ellos afluentes del Sil.

La variada flora de esta sierra está compuesta por abedules, carvallos, robles, arces, hayas, alcornoques y encinas, que le da un especial colorido a su impresionante y singular paisaje, junto con sus típicos pueblos de montaña construidos sobre laderas y con casas rústicas de tejados de pizarras, como Seoane, Folgoso, Pacios, Ferreirós, Santa Eufemia, Seara, Vilamor, Soldón, Ferramulín, Parada dos Montes, Pacios, Esperante, Romeor y otros.

Geológicamente también existe una amplia pluralidad de rocas, como cuarcitas, pizarras, areniscas y rocas carbonatadas, sometidas a grandes y sucesivos procesos tectónicos, que han dado lugar a importantes fenómenos de plegamiento y fracturación de sus estratos, entre los que destacan los pliegues-tumbados que se ven desde la carretera de Quiroga al Alto do Boi.

La minería de esta zona tuvo su importancia en los tiempos antiguos y en los recientes, llegándose a explotar: oro por los romanos en la Mina de La Toca y en la Pobra do Brollón, en los siglos XVIII y XIX hierro en Seceda, Seoane, Folgoso y Vilamor, en el XX hasta hace pocos años se extrajo plomo y cinc en Rubiales, antimonio en Vilarbacú, y actualmente pizarras de techar en Pacios de la Sierra y Folgoso.

Fonte do Souto

Esta fuente se encuentra en la entrada de Parada dos Montes por la carretera de la Pobra de Brollón. Aunque su caudal es pequeño, su importancia se debe al alto contenido en hierro (15 mg/l), que la hace muy apropiada en forma de bebida para los casos de anemia.

Fontes de la Devesa, o Fedo y as Forgas

La primera comprende las fuentes denominadas Rogueira Vermella y Branca, sulfatada-bicarbonatada cálcico-magnésica y ferruginosa (8 mg/l de Fe) de débil mineralización y oligometálica bicarbonatada-sulfatada cálcico-magnésico-sódica respectivamente. Sus aguas surgen entre pizarras y cuarcitas del Ordovícico. La primera es muy apropiada para los caso de anemia y la segunda tiene la particularidad, que su color blanco no es de ella misma, sino del musgo bañado por ella en su surgencia, que tiene ese color y que una vez seco tiene propiedades antisépticas y cicatrizantes. Ese musgo actúa como planta acumulatriz del zinc que lleva disuelto el agua, debido a que en esa zona existen yacimientos metálicos de plomo y cinc, como el que se explotó en las minas de Rubiales. Esto último también sucede con las aguas de O Fedo, cerca de

Ferreirós de Arriba. Este hecho muestra una vez más el interés que tiene la aplicación de la biogeoquímica en la prospección de yacimientos metálicos.

Entre otras fuentes de la misma zona destacan las aguas ferruginosas de As Forgas, que tienen un gran caudal y que también está ligada a la existencia en la zona de minerales ferríferos.

A Coruña

En la provincia de A Coruña existen dos balnearios y una casa de baños, con aguas termales de composiciones químicas sulfuradas en uno de los balnearios y cloruradas en los otros dos casos; pero en todos ellos con aplicaciones terapéuticas.

Geológicamente la provincia de A Coruña pertenece a La denominada Zona de Galicia Tras-os Montes, con un gran predominio de esquistos arenosos con intrusiones de rocas ácidas graníticas y básicas o gabros, existiendo también una larga franja de neises y otras rocas metamórficas, que se extienden desde Malpica hasta Tui, formando una estrecha franja de 6 Km de anchura.

Todo ello hace que exista una gran variedad de rocas y por lo tanto de aguas con muy diferentes composiciones químicas, existiendo la posibilidad que existan aguas termales en algunas de las fracturas profundas, que puedan ser alumbradas por medio de sondeos, como ha ocurrido recientemente en Loureda de Arteixo.

Baños Vellos de Carballo

Está situado en un moderno edificio construido en 1.950 dentro del casco urbano de Carballo, ciudad que dista de A Coruña 34 Km. Sus aguas son sulfurado-bicarbonatada-cloruradas sódicas y tienen una temperatura de 37 °C, siendo apropiadas para afecciones reumáticas y hepáticas, de la piel, vías respiratorias, litiasis renal, trastornos metabólicos y sistema nervioso. Sus modernas instalaciones han sido diseñadas por el Dr. Armijo y constan de baños de burbujas e hidromasaje, chorros, sala de inhalaciones y piscina.

Balneario de Arteixo

Se encuentra dentro de esa ciudad a unos 12 Km de A Coruña, por la N-552 (A Coruña-Fisterra) o por la autovía, que hoy llega hasta Carballo. Tiene varios edificios entre los que destacan la galería de los baños, chorros, inhalaciones y pulverizaciones, el hostel y una capilla, dentro de un amplio jardín. Existen dos fuentes, que tienen diferente temperatura (20 °C y 37 °C) y semejante composición; pues las dos son cloruradas sódicas y litínicas, con una alta salinidad, aplicándose para reumatismo, afecciones del sistema nervioso y dermatosis.

Baños de Loureda - Fonte Saude

Se encuentra en el mismo municipio de Arteixo, en un chalet en el campo. Se trata de una casa de baños, que se surte de un sondeo de 130 m de profundidad, realizado en 1.990 para uso doméstico, y que encontró sorprendentemente agua surgente a 57 °C, cuya composición es de agua clorurada sódica y litánica. Existen cuatro bañeras, que se utilizan para aplicaciones en el caso de enfermedades reumáticas, afecciones de la piel y secuelas traumáticas, también se usa como bebida para tratamientos del aparato digestivo.

Pontevedra

La provincia de Pontevedra es una de las más importantes en la comunidad gallega en cuanto a sus aguas mineromedicinales, por la gran variedad que existe en su composición. Esto se debe a que sus terrenos geológicos son en su mayor parte de naturaleza ígnea, pero con una amplia diversidad de componentes mineralógicos, que aportan a las aguas que entran en contacto con ellos diferentes elementos químicos, según que en las rocas predominen metales alcalinos, alcalinotérreos o ferríferos.

Baños de Brea

Este balneario está ubicado en el bello paraje de Paradela, del municipio de Vila de Cruces, rodeado de bosques y próximo al arroyo de Orza de la cuenca del río Deza. Aunque su manantial era conocido desde tiempos antiguos, estuvo abandonado en las últimas décadas, hasta que en 1.991 se inauguró un nuevo edificio hotel-balneario y se realizó un sondeo, del que surge un agua sulfurada- bicarbonatada-clorurada sódica a 21 °C, aplicadas en baños, hidromasaje, chorros y cámara de vapor. Sus indicaciones terapéuticas son las de afecciones de la piel e hígado, aparato locomotor, vías respiratorias y metabolismo.

Termas de Cuntis

Este balneario cuyo origen también se remonta a la época romana está situado en Cuntis (Pontevedra), en la ribera del río Gallo. Está constituido por un balneario con baños y hotel denominado de A Virxe, construido en 1.886 y una casa de baños conocida como O Castro, rodeada de un amplio bosque junto al río. Recientemente, se ha inaugurado un nuevo edificio para instalaciones balneoterapéuticas, que permitirá un mayor número de tratamientos diarios. Sus aguas son sulfurado-bicarbonatadas-cloruradas y manan en 10 manantiales de diferentes temperaturas desde 25 °C hasta 56 °C. y se usan en las tratamientos de reuma, piel y vías respiratorias.

Balneario de Acuña

Se encuentra en Caldas de Reis, en la margen izquierda del río Umia. Sus aguas ya se utilizaban en épocas anteriores a la dominación romana, que fueron los que establecieron un campamento militar en este lugar, denominándolo «Aqua Calidae».

Fue el canónigo D. Pedro de Acuña el que en 1.813 fundó el actual balneario. En él existen las instalaciones de los baños, chorros, inhalaciones y pulverizaciones, con una construcción anexa de 16 apartamentos para estancia de los agüistas y una piscina en un jardín. Sus aguas que surgen en un manantial y cinco pozos son cloruradas sódicas y litínicas, surgiendo con una temperatura de 40 °C. Su aplicación tópica es apropiada para reumatismo y vías respiratorias.

Balneario de Dávila

Situado en la misma ciudad de Calda de Reis, pero en la otra orilla del río Umia, enfrente del anterior balneario, su origen es también romano, como atestigua un ara encontrada en la arqueta del manantial, dedicada al dios Evovio por un enfermo agradecido llamado Adalus.

La construcción del edificio por D. Joaquín Dávila data del año 1.780. A finales del siglo pasado su nuevo propietario D. David Legeren continuó y amplió su obra, dándole su forma actual de hotel con 32 habitaciones y 49 plazas, baños, inhaladores, pulverizadores, duchas nasales y chorros. Tiene también un amplio jardín con un tupido cañaveral, junto al río. Sus aguas termales a 45 °C son cloruradas sódicas y sus aplicaciones tópicas están recomendadas para afecciones del aparato respiratorio, reumatismos y ginecopatías, y por vía oral para el aparato digestivo.

Hace años un agradecido agüista portugués regaló un curioso azulejo con un escrito, cuya traducción es « A las benditas Caldas de Reyes. El reuma de mi mano, me hizo sufrir mucho tiempo, llena de dolores y magulladuras, pero curé con el tratamiento de estas milagrosas aguas. Aguas santas, bien sabéis. Bendecida seas Caldas de Reyes».

Balneario de A Toxa

Se encuentra en la isla de Louxo de La ría de Arousa, que está unida a la pequeña isla de Toja. Ahora al conjunto de las dos se las denomina Isla de A Toxa. Sus aguas, altamente salinas del tipo cloruradas sódicas y litínicas con 41 °C, aplicadas en unas instalaciones muy modernas, están recomendadas para afecciones reumáticas, respiratorias, de la piel y sistema nervioso.

El balneario está en un lujoso hotel, junto a una bonita y singular capilla, cuya fachada está cubierta de conchas de peregrino, además existe en la misma isla otro gran hotel, que lleva el mismo nombre que tenía antes la isla, es decir, Louxo. También, junto a las posibilidades deportivas de las playas próximas, como la de la Lanzada, existe un campo de golf y pistas de tenis y el famoso casino de esta magnífica isla.

A Troña-Pías

En la carretera de Pontearreas-Mondariz existe un pueblo denominado Pías, en el que hay una colina con un castro celta de una gran extensión y belleza, en cuya cumbre se construyó una ermita dedicada a Santa Tegra y dos artísticos cruceros.

Los estudios arqueológicos que aún se realizan, continuando sus excavaciones, consideran esas inmensas y notables ruinas como la capital de la Galicia céltica.

Balneario de Mondariz

En este famoso balneario destacan sus fuente del Troncoso descubierta en 1.847, en la margen izquierda del río Tea, y la de Gándara descubierta en 1.871. Declarándose sus aguas de utilidad pública en 1.873, se creó el término municipal de Mondariz-Balneario y se comenzó seguidamente la construcción de un lujoso edificio para los tratamientos balneoterapéuticos y un gran hotel proyectado en el año 1.898 por los famosos arquitectos D. Antonio Palacios y D. Genaro de la Fuente, que también diseñaron el clásico templete de la fuente de la Gándara.

Dicho hotel, cuya fachada se conserva, fue destruido por un incendio en 1.973, construyéndose posteriormente un nuevo edificio en el que se encuentran las más modernas instalaciones para uso tónico, como baños de burbujas, con chorro subacuático e hidromasajes, duchas circulares, chorros, parafangos, pulverizadores y nebulizadores y dos piscinas, una interior y otra exterior, utilizándose las dos fuentes citadas para curas en bebida. Sus aguas procedentes del pozo Estrella 3 son bicarbonato-sulfatadas cálcico-sódicas, con temperatura de 15 °C. Las indicaciones terapéuticas de sus aguas son: estrés, estados de agotamiento físico e intelectual, riesgos cardiovasculares, estados postraumáticos, problemas digestivos y afecciones respiratorias.

La fuente de Gándara es bicarbonatada sódico-ferruginosa acompañada de un fuerte burbujeo de ácido carbónico, siendo su temperatura de 16 °C. Su composición es muy apropiada para casos de afecciones estomacales, renales y de anemia.

Además de las aguas utilizadas por el balneario existe a pocos metros del pozo Estrella nº 3, el pozo Estrella nº 2, cuyas famosas aguas de mineralización débil bicarbonato-cloruradas sódico-cálcicas se envasan para bebida de mesa en una planta a 1 Km del pozo, así como las de Fuente del Val, procedente de un pozo situado en la misma planta anterior y con una composición semejante pero más cálcica que sódica y con una mineralización más baja. Las dos son unas excelentes aguas de bebida de mesa, comercializadas en nuestro país y en el extranjero, siendo la primera recomendada para afecciones estomacales y la segunda para las renales.

Balneario de Caldelas de Tui

Este balneario situado en la margen derecha del río Miño, en su último recorrido en el que es frontera con Portugal, en la parroquia de Caldelas del concello de Tui del que dista 9 Km, acceso a Portugal a través de un largo puente por la autopista A-9. Sus aguas se utilizaron desde tiempos remotos, pero el edificio actual se construyó en 1.859, habiéndose renovado y ampliado en 1.972.

El balneario consta de dos edificios, uno en el límite urbano para los tratamientos con baños, duchas, chorros y pulverizaciones y en el que también se encuentra el hotel, y el otro próximo a éste, pero rodeado de campos y en la orilla del río, donde surge el manantial y existe una sala para inhalaciones. Las aguas son sulfuradas-cloruradas

sódicas con 41 °C, y están recomendadas para tratamientos de reuma, artrosis, vías respiratorias, piel y aparato digestivo.

Ourense

Ourense tiene un gran número de manantiales termales, que por surgir en fracturas de gran profundidad alcanzan las temperaturas más altas de toda Galicia. Sus aguas están utilizadas en varios balnearios y plantas envasadoras, y además existen muy buenas posibilidades de aprovechamientos de otros, que hasta ahora sólo tienen uso tradiional.

Balneario baños de Molgas

Este balneario, situado en la ciudad de Molgas en la margen izquierda del río Arnoia, que también tiene orígenes romanos y tuvo un gran uso en el siglo XI, sigue siendo uno de los más utilizados actualmente en Galicia. Sus instalaciones de inhalaciones, baños, duchas y chorros son de lo más modernas y eficaces en los tratamientos de artritis, piel, neuralgias y vías respiratorias, aprovechando unas aguas sulfuradas-bicarbonatadas sódicas y litínicas, que surgen en un manantial a 40 °C.

Vila Termal de Arnoia

Esta es la última estación termal construida en Galicia, a 5 Km de Rivadavia, en el término de Arnoia, junto a Reza, y muy próxima al río Miño; por lo que se puede hacer viajes turísticos en un catamarán, además de otros deportes por su entorno montañoso, como equitación, ciclismo y senderismo. Ella es una de las obras de la Fundación San Rosendo de Ourense, y fue inaugurada en 1.995, por el presidente de la Xunta, Excmo. Sr. D. Manuel Fraga. Consta de tres edificios adosados, con el hotel Arnoia y los otros son dos residencias para la tercera edad y balneario con unas modernas instalaciones terapéuticas, realizadas por la especializada industria orensana de Subita, entre las que destacan dos piscinas y una cabina de tratamientos estéticos.

Sus aguas proceden de un sondeo de 250 m de profundidad y tienen una composición sulfurado-bicarbonato-sulfatada y clorurada sódica con una temperatura de 16 °C. Sus indicaciones son muy variadas, resaltando su programa anti-estrés, con chorros, baños de hidromasaje y burbujas, masajes y sauna.

Balneario de O Carballiño

Su magnífico edificio, construido en 1.900, está situado en el límite occidental del núcleo urbano, rodeado de un grandioso y bonito jardín bordeado por el río Arenteiro. Sus aguas, sulfuro-bicarbonatadas sódico-cálcicas de 26 °C, son recomendadas para los tratamientos de enfermedades reumáticas, de las vías respiratorias, de la piel, del aparato digestivo y metabólicas. Sus instalaciones tienen baños con hidromasaje, duchas, chorros, inhalaciones y nebulizaciones.

Balneario Caldas de Parovia

Este balneario se encuentra en el mismo municipio de O Carballiño, pero a las afueras de la ciudad a 2 Km, en la margen occidental del arroyo Porto; de ahí su nombre dado por los romanos de Parto Vía (Puerta de la Vida). Los baños y duchas se surten con unas aguas sulfuradas-bicarbonatadas sódicas de 34 °C, apropiadas para el tratamiento de enfermedades de reumatismo, piel, vías respiratorias y aparato circulatorio; pudiéndose beber en una fuente interior al edificio y dos exteriores en el caso de afecciones del hígado o de litiasis renal.

Ourense y sus alrededores

As Burgas

Esta fuente se encuentra situada dentro del casco urbano de Ourense (Warmsee, para los Suevos, es decir, mar caliente), consta de tres estrados con fuentes de distintas épocas y por lo tanto de estilo arquitectónico diferente. La de arriba es la más antigua y en ella hay dos aras romanas, la de enmedio es la más moderna y tiene un gran estanque con una inscripción en bronce en la que la dama Calpurnia cumple con un voto que hizo a las ninfas de estas aguas, por su curación. La de abajo es clásica y tiene tres caños, que son los que se usan para beberla, para tratamiento del aparato digestivo, del hígado o de las vías urinarias. Sus aguas, que salen a la temperatura más alta de todas las termales de Galicia (67°C), tienen una alta salinidad y son bicarbonatadas sódicas y litínicas, no sulfuradas, aunque sí algo cloruradas.

Burga de Chabasqueira

Está situada muy cerca del puente sobre el río Miño de la carretera Ourense-Vigo y Santiago. Sus aguas a 60 °C manan en el interior de un pequeño edificio construido de bloques de piedra y van a parar a tres piscinas de hormigón, donde suelen bañarse los agüistas enfermos de reuma o con dermatosis. Su composición es similar a las de las otras burgas de la ciudad y de la margen derecha del río Miño.

Fuente del Tinteiro

Se encuentra también en el borde del cauce del río Miño, cerca de la estación de autobuses de Ourense. Existe un pozo del que se extrae el agua con cazos o botellas introducidas atadas a un largo palo. Su agua es sulfurada-bicarbonatada sódica y tradicionalmente se usa para afecciones del aparato digestivo, de la piel, del hígado y vías urinarias, siendo su temperatura de 43 °C.

Burgas de Outeriz

Son dos surgencias, Alta y Baixa, situadas muy cerca del cauce del río Miño, en el término municipal de Ourense, a unos 3 Km de dicha capital, a la altura del desdoblamiento de la carretera N-120 de Vigo a Ourense. Sus aguas manan a través de unas pe-

queñas fracturas en el afloramiento de rocas graníticas, con una temperatura de 60 °C y una composición sulfurado-bicarbonatada sódicas y litínicas, apropiadas para un amplio uso terapéutico, sin embargo debido a su difícil acceso, se encuentran sin instalaciones ni aprovechamiento alguno, a pesar de que su caudal sobrepasa los 5 l/sg.

Aguas de Verín

En la amplia depresión de Verín, ciudad situada al Sudeste de la provincia de Ourense, y relacionados con la larga fractura de Laza existe una gran riqueza de aguas minerales, que dieron lugar a cinco importantes balnearios de los que hoy sólo hay tres en los que se usan sus aguas para bebidas de mesa envasadas. Uno de ellos es el de Requeixo o Vilaza, que también tuvo planta de envasado, pero que actualmente no funciona desde 1.961; otro hoy en estado ruinoso fue el de Caldeliñas, que dejó de usarse en 1.946. Los otros tres Sousas, Fontenova y Cabreiroá, están envasando unas aguas de mesa de buena calidad y gran renombre en nuestro país y en el extranjero. Estas aguas bicarbonatadas alcalinas encuentran indicación en los procesos dispépticos hipersecretorios, enfermedades hepáticas, procesos metabólicos relacionados con hiperglucemia o hiperuremia, litiasis renal y biliar.

Balneario de Sousas

Este balneario situado en límite urbano Sur de Verín, se utiliza ahora sólo para tratamientos por vía oral o hidropínica, en una fuente que se encuentra en un antiguo y espléndido quiosco hexagonal. Las cualidades de sus aguas las hace apropiadas para afecciones renales, hepáticas, del aparato digestivo y tratamientos diuréticos. Actualmente existe una planta envasadora, que utiliza un pozo del que se extrae agua fuertemente mineralizada y con gas de composición bicarbonatada-clorurada-sulfatada sódica y otro con un agua sin gas de mineralización débil bicarbonatada sódica, surgiendo las dos con una temperatura de unos 20 °C.

Cabreiroa

Esta planta envasadora situada a 1,2 Km del núcleo urbano de Verín, que tiene también un gran edificio de balneoterapia construido en 1.906 hoy sin uso, embotella un agua de mineralización débil bicarbonatada cálcica-sódica y otra bicarbonatada sódica fuertemente mineralizada y con gas. Esta puede beberse en una fuente construida bajo un magnífico quiosco octogonal muy artístico, donde se observa a través de dos cilindros de cristal como surge con gran cantidad de burbujas de gas y a una temperatura de 17 °C. Existe además otro pozo del que surge un agua de débil mineralización bicarbonatada sódica cálcica sin gas, muy apropiada para bebida de mesa y también con muy buenas cualidades para la diuresis renal y para el aparato digestivo.

Fontenova

Las aguas de esta planta envasadora situada en el centro urbano de Verín se utilizaron para el balneario que se construyó en 1.935, cesando su actividad en 1.960;

pero continuando su uso como agua de mesa envasada de fuerte mineralización y con gas del tipo bicarbonatada-sulfurada sódica y litfónica, que surge con una temperatura de 20 °C. En otro pozo de la misma finca surge un agua sin gas bicarbonatada sódica y de débil mineralización con una temperatura de 16 °C, siendo una buena agua de mesa y además muy digestiva.

AGRADECIMIENTOS

Mi conocimientos sobre las aguas Minero-medicinales de Galicia se debe a mi intervención en el trabajo de campo del estudio e inventariado de las «Aguas Minerales de Galicia», encargado por la Consellería de Industria e Comercio de la Xunta de Galicia a las empresas Geomecánica y Aguas, S.A. y Gabinete Minero TEY, S.A. Por este motivo agradezco mucho toda la ayuda que tuve de sus respectivos directores y de todo el personal de las mismas.

Mi recorrido por las tierras gallegas me ha permitido conocer aún más sus maravillosos paisajes y aumentar en un gran número mis buenos amigos, entre los propietarios y personal de los balnearios y plantas envasadoras, los profesionales farmacéuticos y médicos, de los alcaldes y funcionarios de los ayuntamientos y de todas las personas que en sus pueblos me indicaron o acompañaron para localizar muchos de esos manantiales, que sin su ayuda hubiera sido muy difícil encontrarlos.

Mi cariño por Galicia ha crecido desde los años 56 y 57, en los que comencé a trabajar en la prospección de minerales metálicos, que realizaba el Instituto Geológico y Minero en esa comunidad, bajo la dirección del Dr. D. Juan Manuel López Azcona, del que aprendí los principios de la geología de campo, y quién también después me informó mucho sobre este estudio de aguas, ya que su conocimiento sobre las aguas minero-medicinales de A Coruña y Pontevedra eran muy detallados.

BIBLIOGRAFIA

- Armijo Valenzuela, J., San Martín Bacalco, J., Curas Balnearias y Climatológicas. Ed. Complutense. Madrid, 1.994.
- Castany, G., Prospección y Explotación de las Aguas Subterráneas. Ed. Omega. Barcelona, 1.975.
- Cliff, O., Weathering. Ed. Longman. London, 1.984.
- Custodio, E., Llamas, M.R., Hidrogeología Subterránea. Tomos I y II, Ed. Omega. Barcelona, 1.988.
- Freeze, R.A., Cherry, J.A., Groundwater. Ed. Prentice Hall. New Jersey 1.979.
- Geomecánica y Aguas. Las aguas minerales de Galicia. Ed. Consellería de Industria y Comercio de la Xunta de Galicia. Santiago de Compostela. 1.995.
- Letourneur, J., Michel, Géologie du Génie Civil. Lib. Armand Colin. Paris, 1.971,
- Ramírez Ortega, A., Rial Lemos, M.E., Ramírez Masferrer, J.A., Revista ANET, nº 9. Madrid, 1.997. y Revistas TERMAS, nº 4, y 5. Asociación de Balnearios de Galicia. Santiago de Compostela, 1.997.

EFECTO DE LA ELIMINACIÓN PROGRESIVA DE INDIVIDUOS ATÍPICOS EN LA REGRESIÓN POR ETAPAS

FRANCISCO JAVIER DÍAZ-LLANOS Y SAINZ-CALLEJA
y CARMEN CERMEÑO CARRASCO

RESUMEN

Esta nota describe, de manera sucinta, el principio de la **regresión por etapas con retro-eliminación reiterada de individuos atípicos**. La ilustración, mediante ejemplos numéricos de dimensiones pequeñas lo cual permite seguir el proceso metodológico con una simple calculadora y las tablas de las funciones de distribución de las variables aleatorias: T_n Student-Fisher (1908) y χ_n^2 de Helmert (1875) —muestra que: **la eliminación progresiva de individuos atípicos uno a uno (12)— y no en grupos (13), puesto que conllevaría un tiempo de cálculo prohibitivo- conduce, en ocasiones, a resultados muy distintos en cuanto a la ecuación de regresión lineal estimada.**

INTRODUCCIÓN

Entre los cinco métodos¹ que nos permiten retener las variables más correlacionadas con la variable a explicar por una parte y, las menos correlacionadas entre ellas por otra, el más difundido para la elaboración de un modelo de regresión lineal múltiple —a partir de un conjunto de variables cuantitativas— es el de la **regresión paso a paso (stepwise regression, régression pas à pas)**. Este método, basado en la noción del coeficiente de correlación parcial y en la contribución marginal de cada variable explicativa, está expuesto de forma didáctica, en BAILLARGEON (1985, pp. 182-199). Aunque éste es el más difundido, sin embargo, hemos preferido retener el de la **regresión por etapas (stagewise regression, régression par étage)** dado que, éste último, presenta la ventaja frente a los otros de que, en el proceso de elección de variables permite **minimizar las intercorrelaciones de las series explicadas por estudio del residuo**. En este sentido, PALM (27) indica que, las técnicas clásicas tales como: la selección progresiva, regresiva o paso a paso tienen en común el «**no garantizar jamás la obtención del mejor subconjunto de variables para un número dado de variables**».

¹ Todas las regresiones posibles, eliminación progresiva, selección progresiva, regresión paso a paso y regresión por etapas.

Aunque el método de la **clásica regresión por etapas** contemplado en DRAPER y SMITH (1981, pp. 337-341), BOURBONNAIS y USUNIER (1992, pp. 119-121) y BOURBONNAIS (1998, pp. 105-109) ya se ha aplicado y comparado con el de la **regresión paso a paso** a principios de los años setenta por LUND (24) sin embargo, su difusión en cuanto a su exposición e implementación en un paquete de programas de estadística no ha sido la misma. Por tal motivo, **esta nota se articula en dos partes fundamentales**: la primera, consiste en la presentación de una exposición —lo más didáctica posible— de la **regresión por etapas con retro-eliminación inicial reiterada de individuos atípicos**. La segunda, consiste en la presentación de un CONJUNTO DE EJERCICIOS destinados a ilustrar el principio de dicha regresión.

PROCESO METODOLÓGICO

El proceso metodológico que proponemos en este artículo en el cual está incluido **la clásica regresión por etapas**, aunque aún **no está implementado íntegramente** en ningún paquete de programas de estadística, «SE PUEDE RECONSTRUIR» —pero ya no de forma automática— **haciendo uso de programas existentes** en el mercado tales como: el STATlab (9) y el STAT-ITCF (1).

La **clásica regresión por etapas** (6) permite **minimizar las intercorrelaciones de las variables exógenas de manera óptimal**.

Partimos de, **una variable** (explicada, respuesta, exógena, dependiente) y, de **p variables** (explicativas, de control, endógenas, independientes, regresoras) cuantitativas.

FASES DEL PROCESO METODOLÓGICO

1. Construcción de la tabla de datos originales.

La tabla de datos debe guardar la siguiente forma:

y_1	x_{11}	x_{12}	x_{13}	.	.	x_{1p}
y_1	x_{11}	x_{12}	x_{13}	.	.	x_{1p}
y_2	x_{21}	x_{22}	x_{23}	.	.	x_{2p}
.
.
y_n	x_{n1}	x_{n2}	x_{n3}	.	.	x_{np}

2. Construcción de la matriz de correlaciones de BRAVAIS-PEARSON entre las variables explicativas.

La matriz de correlaciones viene definida de la siguiente manera:

$$R = D_p^{-\frac{1}{2}} P D_p^{-\frac{1}{2}}$$

donde,

$$P = X^T X - \frac{1}{n} X^T 1_n 1_n^T X$$

D_p : matriz constituida por los elementos de la diagonal de P .

$$1_n = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^n$$

X : matriz que contiene las variables explicativas de dimensión $n \times p$.

Una interpretación detallada del significado del coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON se encuentra en DROESBEKE (1988, pp. 335-341)

Conviene evitar correlaciones entre variables explicativas con valor absoluto cercano a 1 y tratar de evitar situaciones en las que, la correlación entre las variables explicativas sea mayor que, la correlación de esas variables con la variable explicada.

3. Test de detección de una posible presunción de multicolinealidad.

Entre el test de KLEIN y el test de FARRAR y GLAUBER existen diferencias, en cuanto a la detección de una posible presunción de multicolinealidad (6). El principal motivo por el cual hemos retenido, en nuestro proceso metodológico, el test de FARRAR y GLAUBER es que, éste, **se basa en una ley de probabilidad mientras el de KLEIN no. La ley de probabilidad es la χ^2 de Helmert (1875)**. El desarrollo de estos dos test, así como, un ejemplo en el cual, se muestran diferencias —en cuanto a sus resultados— se encuentran, de forma didáctica, en BOURBONNAIS (1998, pp. 100-103). Una exposición exhaustiva del test de FARRAR y GLAUBER se encuentra en (19). Con respecto al test de FARRAR y GLAUBER, el resultado negativo de una posible presunción de multicolinealidad, puede verse cambiado por una disminución en el nivel de significación, como se observa más adelante, en esta nota.

La **regla general de decisión del test de FARRAR y GLAUBER** extraída de BOURBONNAIS (1998, pp. 101-103) y adaptada a nuestra nomenclatura es la siguiente,

Si $\left[(n-1) - \frac{[2(p+1)+5]}{6} \right] \log_e [\text{Det}(R)] \leq \overset{-1}{F} \chi_{\frac{n(p+1)}{2}}^2 (1-\alpha)$ se acepta H_0 , no hay presunción de multicolinealidad.

Si $\left[(n-1) - \frac{[2(p+1)+5]}{6} \right] \log_e [\text{Det}(R)] > \bar{F}^{-1} \chi^2_{\frac{p(p+1)}{2}} (1-\alpha)$ se rechaza H_0 , hay presunción de multicolinealidad.

Donde,

n : es el número de individuos activos en el modelo de regresión lineal.

p : es el número de variables explicativas.

$\text{Det}(R)$: es el determinante de la matriz de correlaciones entre las variables explicativas.

$\bar{F}^{-1} \chi^2_{\frac{p(p+1)}{2}}$: es la función inversa de la función de distribución de la variable aleatoria χ^2 de Helmert (1875) con $p(p+1)/2$ grados de libertad y para un área de $(1-\alpha)$.

4. Estudio de la matriz simétrica definida positiva.

$$\begin{pmatrix} \mathbf{1}_n^T \mathbf{1}_n & \mathbf{1}_n^T \mathbf{X}_{(r)} \\ \mathbf{X}_{(r)}^T \mathbf{1}_n & \mathbf{X}_{(r)}^T \mathbf{X}_{(r)} \end{pmatrix}$$

donde,

$$\mathbf{1}_n = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^n$$

$\mathbf{X}_{(r)}$: es la matriz —no aleatoria— de dimensión $(n, r+1)$ que contiene las variables explicativas retenidas en la r -ésima etapa.

Una matriz de esta forma va a ser —desde un punto de vista operativo— **el eje central del proceso de elección de variables**. Tendremos que invertirla tantas veces como variables retenidas, aumentando así su orden sucesivamente desde 2 hasta las variables retenidas más 1.

Cuando esta matriz sea singular es aconsejable llevar a cabo alguna de estas dos situaciones:

1. La eliminación de **una o más variables explicativas**.
2. La aplicación de alguna de las **técnicas de regresión puestas a punto para atenuar los efectos de la multicolinealidad**.

Entre estas técnicas, vamos a exponer —tan sólo— los principios de cinco de ellas. Tres de ellos, están basados en el **cálculo de nuevas variables explicativas**, siendo las siguientes:

- La regresión en función de las componentes principales.
- La regresión propuesta por WESTER, GUNST y MASSON (1974).
- La regresión por los mínimos cuadrados parciales propuesta por Harald MARTENS, Herald WOLD y Svante WOLD (1983).

Y las dos restantes en los estimadores «estrechos», siendo estas:

- La regresión pseudo-ortogonal (1970)
- La regresión utilizando los estimadores de JAMES y STEIN (1961)

Estas cinco técnicas están expuestas —de forma didáctica— en el artículo de PALM y IEMMA (28).

Una exposición exhaustiva de otras técnicas, derivadas de la **regresión con restricciones lineales y no lineales**, se encuentran contempladas en los artículos de CAZES (10,11).

Fases del procedimiento metodológico

1. Elegir como primera variable explicativa aquella cuyo coeficiente de correlación lineal con la variable sea el **máximo**.

	x_1	x_2	x_3	.	.	x_p
y	r_{y,x_1}	r_{y,x_2}	r_{y,x_3}	.	.	r_{y,x_p}

2. Consideremos que la variable elegida ha sido la x_1 .

3. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable explicada y la variable explicativa elegida es —significativamente— diferente a cero.

4. El modelo lineal, bajo la forma matricial, a una variable explicativa y, n observaciones —en la primera etapa— puede escribirse de la siguiente forma:

$$\begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ \vdots \\ y_n^{(1)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} \\ 1 & x_{21} \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0^{(1)} \\ \beta_1^{(1)} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \epsilon_1^{(1)} \\ \epsilon_2^{(1)} \\ \vdots \\ \epsilon_n^{(1)} \end{pmatrix}$$

donde,

$$\begin{pmatrix} y_1^{(i)} \\ y_2^{(i)} \\ \vdots \\ y_n^{(i)} \end{pmatrix} \in: \text{es un vector aleatorio observable con valores en } \mathbb{R}^n.$$

$$\begin{pmatrix} 1 & x_{11} \\ 1 & x_{21} \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} \end{pmatrix} = (1_n | X_{(i)}): \text{matriz de datos de dimensi3n } (n,2) \text{ que contiene:}$$

$$1_n = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^n$$

$X_{(i)}$: matriz de datos no aleatoria observada que contiene la primera variable retenida en la primera etapa.

$\begin{pmatrix} \beta_0^{(i)} \\ \beta_1^{(i)} \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^2$: es un vector no aleatorio no observable con valores en que contiene los parámetros desconocidos del modelo en la primera etapa.

$$\begin{pmatrix} \epsilon_1^{(i)} \\ \epsilon_2^{(i)} \\ \vdots \\ \epsilon_n^{(i)} \end{pmatrix} \in: \text{es un vector aleatorio no observable con valores en } \mathbb{R}^n.$$

A partir de este modelo, pretendemos estimar el vector no aleatorio —no observable— que contiene los parámetros del modelo lineal: $\beta^{(i)}$

$$\beta^{(i)} = \begin{pmatrix} \beta_0^{(i)} \\ \beta_1^{(i)} \end{pmatrix}$$

Para ello, aplicamos el método de **mínimos cuadrados ordinarios** (MCO) que consiste en **minimizar la suma de cuadrados de los errores** (Bourbonnais, 1998, pp. 49-50). Diferenciando esta **suma de cuadrados** con respecto a $\beta^{(i)}$ e igualando a cero obtenemos el vector aleatorio $\hat{\beta}^{(i)}$.

$$\hat{\beta}^{(i)} = \begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(i)} \\ \hat{\beta}_1^{(i)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1_n^T 1_n & 1_n^T X_{(i)} \\ X_{(i)}^T 1_n & X_{(i)}^T X_{(i)} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1_n^T \\ X_{(i)}^T \end{pmatrix} y^{(i)}$$

Dado que $\hat{\beta}^{(1)}$ es función de $y^{(1)}$, éste es un vector aleatorio y, por lo tanto, sus componentes $\hat{\beta}_0^{(1)}$ y $\hat{\beta}_1^{(1)}$, son variables aleatorias. Si en esta expresión sustituimos el vector aleatorio —observable— $y^{(1)}$ por un vector concreto, obtendremos las estimaciones de los parámetros $\hat{\beta}_0^{(1)}$ y $\hat{\beta}_1^{(1)}$. Estas estimaciones las expresamos por: $\hat{\beta}_0^{*(1)}$ y $\hat{\beta}_1^{*(1)}$.

Finalmente el modelo estimado —en la primera etapa— se expresa de la siguiente manera:

$$y^{*(1)} = \hat{\beta}_0^{*(1)} + \hat{\beta}_1^{*(1)}x_1$$

5. Cálculo de los siguientes indicadores:

- a: residuos
- b: residuos normalizados
- c: residuos estudentizados
- d: distancia de Dennis R. COOK

Estos cuatro indicadores —recogidos en MONTGOMERY y RUNGER (1996, pp. 571-579)— se encuentran adaptados a nuestra nomenclatura de la siguiente manera.

a: *residuos* $e^{(r)}$, $r = 1, 2, \dots, p$

El vector aleatorio residuo, correspondiente a la primera etapa, viene definido de la siguiente forma:

$$e^{(1)} = \begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n^{(1)} \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} 1 & x_{11} \\ 1 & x_{21} \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ 1 & x_{n1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(1)} \\ \hat{\beta}_1^{(1)} \end{pmatrix}$$

donde,

$\begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n^{(1)} \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^n$: es un vector aleatorio observable con valores en \mathbb{R}^n asociado a la primera etapa.

$\begin{pmatrix} 1 & x_{11} \\ 1 & x_{21} \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ 1 & x_{n1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(1)} \\ \hat{\beta}_1^{(1)} \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^n$: es un vector aleatorio con vaores en \mathbb{R}^n asociado a la primera etapa

cuya i -ésima observación la podemos expresar por, $e_i^{(1)}$

El vector residuo estimado —en la primera etapa— lo expresamos con la siguiente notación, $e^{(1)}$

b: residuos normalizados: $e_s^{(r)}, r = 1, \dots, p$

Los residuos normalizados se calculan a partir de los residuos.

El vector residuo normalizado estimado —en la primera etapa— lo expresamos con la siguiente notación, $e_s^{*(1)}$.

La i -ésima observación de este vector la calculamos utilizando la fórmula:

$$e_{s_i}^{*(1)} = \frac{e_i^{*(1)}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (e_i^{*(1)})^2}{[n - (p + 1)]}}}$$

c: residuos estudentizados: $e_t^{(r)}, r = 1, \dots, p$

Los residuos estudentizados se calculan a partir de los residuos normalizados.

El vector residuo estudentizado estimado —en la primera etapa— lo expresamos con la siguiente notación, $e_t^{*(1)}$.

La i -ésima observación de este vector la calculamos utilizando la fórmula:

$$e_{t_i}^{*(1)} = \frac{e_{s_i}^{*(1)}}{\sqrt{[1 - h_{ii}]}}$$

d: Distancia de Dennis R. COOK: $D^{(r)}, r = 1, \dots, p$

La distancia de Dennis R. COOK se calcula a partir de los residuos estudentizados.

El vector distancia de COOK estimado —en la primera etapa— lo expresamos así: $D^{*(1)}$.

La i -ésima observación de este vector la calculamos utilizando la fórmula siguiente:

$$D_i^{*(1)} = \frac{\left[e_{t_i}^{*(1)} \right]^2 h_{ii}}{(p + 1) \left[(1 - h_{ii}) \right]}$$

donde:

p : es el número de variables explicativas y,

h_{ii} : es el i -ésimo elemento que está en la diagonal principal de la matriz H

$$H = X(X^T X)^{-1} X^T$$

Siendo X la matriz del modelo lineal de la dimensión $(n, p+1)$.

Entre estos cuatro indicadores —ya definidos— hemos de indicar que, en el proceso metodológico, hemos retenido el de la **distancia de COOK** (12). Un individuo se considera atípico cuando la **distancia de COOK** es mayor que 1 tal como, indican MONTGOMERY y RUNGER (1996, pp. 571-579). En este caso, procedemos a su eliminación e **reiniciaremos** el proceso metodológico con un individuo menos ya que, si no, **podría afectar en la elección del modelo lineal retenido**. Este punto está desarrollado en uno de los dos ejercicios propuestos en esta nota.

La **distancia de COOK** según indican PALM y IEMMA (27), es una función creciente del cuadrado del residuo y de una medida del alejamiento del individuo en relación al, centro de gravedad —de la nube de puntos— en el espacio de las variables explicadas, siquiera si su regresión comporta un término independiente. Esta distancia está directamente relacionada con la **distancia de MAHALANOBIS** entre un individuo y el vector de las medias (30). Una exposición didáctica de la **distancia de MAHALANOBIS** se encuentra en DAGNELIE (1977, pp. 227-250). Para una exposición exhaustiva ver el artículo de MAHALANOBIS (25).

Detección de una eventual dependencia de los errores.

Entre el test de DURBIN y WATSON y el test de BREUSCH-GODFREY, hemos retenido este último dado que, mientras el primero sólo permite detectar una autocorrelación de orden 1 el segundo, permite contrastar una autocorrelación de orden superior a 1. El test de BREUSCH-GODFREY se basa en la ley de probabilidad de la χ^2 de Helmert (1985). El desarrollo de este test, así como, una comparación con el DURBIN y WATSON, se encuentra —de forma didáctica— en BOURBONNAIS (1998, pp. 116-120). Para una exposición exhaustiva del test de BREUSCH-GODFREY revisar (8,22).

Test para detectar la normalidad de los errores.

Entre los tests de asimetría y kurtosis, y el test de JARQUE y BERA, retenemos el de JARQUE y BERA dado que, esta fundamentado en la noción de asimetría y de kurtosis. Este test, permite verificar la normalidad de una distribución estadística. El test de JARQUE y BERA, al igual que el test de FARRAR y GLAUBER, se basan en la ley de probabilidad de la χ^2 de Helmert (1985). El desarrollo de este test, se encuentra —de forma didáctica— en BOURBONNAIS (1998, p. 220). Para una exposición exhaustiva del test ver los artículos de JARQUE y BERA (4,5).

El proceso metodológico continúa en el caso que estos dos test den negativos.

6. Elegir como segunda variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual estimada —en la primera etapa— **sea máximo**.

	x_1	x_2	x_3	.	.	x_p
$e^{*(1)}$	$r_{e^{*(1)},x_1}$	$r_{e^{*(1)},x_2}$	$r_{e^{*(1)},x_3}$.	.	$r_{e^{*(1)},x_p}$

6. Consideremos que la variable elegida ha sido la x_2 .

7. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada —en la primera etapa— y la variable explicada elegida es —significativamente— diferente de cero.

La regla general de decisión asociada al test de hipótesis bilateral —para el coeficiente de correlación poblacional— que a continuación presentamos,

$$H_0: \rho_{e^{*(1)},x_2} = 0$$

$$H_1: \rho_{e^{*(1)},x_2} \neq 0$$

adaptada a nuestra nomenclatura es la siguiente:

$$\text{Si } \bar{F}_{T_{n-2}}^{-1} \left(\frac{\alpha}{2} \right) \leq \sqrt{n-2} \frac{r_{e^{*(1)},x_2}}{\sqrt{1-r_{e^{*(1)},x_2}^2}} \leq \bar{F}_{T_{n-2}}^{-1} \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) \text{ se acepta } H_0$$

$$\text{Si } \bar{F}_{T_{n-2}}^{-1} \left(\frac{\alpha}{2} \right) > \sqrt{n-2} \frac{r_{e^{*(1)},x_2}}{\sqrt{1-r_{e^{*(1)},x_2}^2}} > \bar{F}_{T_{n-2}}^{-1} \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) \text{ se acepta } H_1$$

donde,

$$\bar{F}_{T_{n-2}}^{-1} \left(\frac{\alpha}{2} \right) \text{ y } \bar{F}_{T_{n-2}}^{-1} \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right)$$

representan las funciones inversas de la función de distribución de la variable aleatoria T de Student-Fisher con n-2 grados de libertad para un área de

$$\frac{\alpha}{2} \text{ y } 1 - \frac{\alpha}{2} \text{ respectivamente.}$$

El proceso de elección de variables continúa mientras que, se vaya rechazando la hipótesis nula. Consideraremos que se rechaza la hipótesis nula para que el proceso continúe.

8. El modelo lineal, bajo la forma matricial, a dos variables explicativas y, n observaciones —en la segunda etapa— puede escribirse de la siguiente forma:

$$\begin{pmatrix} y_1^{(2)} \\ y_2^{(2)} \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n^{(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} \\ 1 & x_{21} & x_{22} \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0^{(2)} \\ \beta_1^{(2)} \\ \beta_2^{(2)} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \epsilon_1^{(2)} \\ \epsilon_2^{(2)} \\ \cdot \\ \cdot \\ \epsilon_n^{(2)} \end{pmatrix}$$

Para evitar posibles reiteraciones, el significado de las matrices que aparecen en este fórmula es el mismo que en la primera etapa. Lo único que varía son: las dimensiones de la matriz de datos y la de parámetros.

A partir de este modelo, pretendemos estimar el vector no aleatorio —no observable— que contiene los parámetros del modelo lineal a estimar $\beta^{(2)}$:

$$\beta^{(2)} = \begin{pmatrix} \beta_0^{(2)} \\ \beta_1^{(2)} \\ \beta_2^{(2)} \end{pmatrix}$$

Para ello, aplicamos el método de mínimos cuadrados ordinarios (MCO) y obtenemos,

$$\hat{\beta}^{(2)} = \begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(2)} \\ \hat{\beta}_1^{(2)} \\ \hat{\beta}_2^{(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_n^T I_n & I_n^T X_{(2)} \\ X_{(2)}^T I_n & X_{(2)}^T X_{(2)} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} I_n^T \\ X_{(2)}^T \end{pmatrix} y^{(2)}$$

Dado que $\hat{\beta}^{(2)}$ es función de $y^{(2)}$, éste, es un vector aleatorio y, por lo tanto, sus componentes $\hat{\beta}_0^{(2)}$, $\hat{\beta}_1^{(2)}$ y $\hat{\beta}_2^{(2)}$, son variables aleatorias. Si en esta expresión sustituimos el vector aleatorio —observable— $y^{(2)}$ por un vector concreto, obtendremos las estimaciones de los parámetros. $\beta_0^{(2)}$, $\beta_1^{(2)}$ y $\beta_2^{(2)}$. Estas estimaciones las expresamos por: $\hat{\beta}_0^{(2)}$, $\hat{\beta}_1^{(2)}$ y $\hat{\beta}_2^{(2)}$.

Finalmente el modelo estimado —en la segunda etapa— se expresa en la siguiente manera,

$$y^{*(2)} = \hat{\beta}_0^{*(2)} + \hat{\beta}_1^{*(2)} x_1 + \hat{\beta}_2^{*(2)} x_2$$

9. Cálculo de los siguientes indicadores

- * residuos
- * residuos normalizados
- * residuos estudentizados
- * distancia de Dennis R. COOK

Para la i -ésima observación el residuo correspondiente —en la segunda etapa— se expresa de la siguiente manera: $e_i^{(2)}$

Dado que, en esta etapa se aplican las mismas fórmulas que en la primera, **omitimos** las fórmulas para el cálculo de los nuevos indicadores.

Si en esta etapa, hubiese habido al menos un individuo atípico cuya distancia de COOK es mayor que 1, habría que eliminarlo y, reiniciar el proceso metodológico con un individuo menos.

10. Elegir como tercera variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual estimada —en la segunda etapa— **sea máximo**.

	x_1	x_2	x_3	x_4	.	x_p
$e^{(2)}$	$r_{e^{(2)},x_1}$	$r_{e^{(2)},x_2}$	$r_{e^{(2)},x_3}$	$r_{e^{(2)},x_4}$.	$r_{e^{(2)},x_p}$

11. Consideremos que la variable elegida ha sido x_3 .

12. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada en la segunda etapa y la variable explicada elegida es —significativamente— diferente a cero.

Igualmente, dado que, en esta etapa se aplican las mismas fórmulas que en la primera, omitimos las fórmulas que nos permiten tomar la decisión de seguir rechazando la hipótesis nula.

El proceso de elección de variables continuará mientras se vaya rechazando la hipótesis nula. Consideremos que se rechaza la hipótesis nula para que el proceso continúe.

13. El modelo lineal, bajo la forma matricial, a tres variables explicativas y, n observaciones —en la tercera etapa— puede escribirse de la siguiente forma:

$$\begin{pmatrix} y_1^{(3)} \\ y_2^{(3)} \\ y_3^{(3)} \\ \vdots \\ y_n^{(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & x_{13} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & x_{23} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & x_{n3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0^{(3)} \\ \beta_1^{(3)} \\ \beta_2^{(3)} \\ \beta_3^{(3)} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \epsilon_1^{(3)} \\ \epsilon_2^{(3)} \\ \vdots \\ \epsilon_n^{(3)} \end{pmatrix}$$

A partir de éste modelo, pretendemos estimar el vector no aleatorio —no observable— que contiene los parámetros del modelo lineal a estimar: $\beta_0^{(3)}$

$$\beta^{(3)} = \begin{pmatrix} \beta_0^{(3)} \\ \beta_1^{(3)} \\ \beta_2^{(3)} \\ \beta_3^{(3)} \end{pmatrix}$$

Para ello, aplicamos el método de mínimos cuadrados ordinarios (MCO) y obtenemos,

$$\hat{\beta}^{(3)} = \begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(3)} \\ \hat{\beta}_1^{(3)} \\ \hat{\beta}_2^{(3)} \\ \hat{\beta}_3^{(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_n^T I_n & I_n^T X_{(3)} \\ X_{(3)}^T I_n & X_{(3)}^T X_{(3)} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} I_n^T \\ X_{(3)}^T \end{pmatrix} y^3$$

Dado que $\hat{\beta}^{(3)}$ es función de y^3 , éste, es un vector aleatorio y, por tanto, sus componentes $\hat{\beta}_0^{(3)}$, $\hat{\beta}_1^{(3)}$, $\hat{\beta}_2^{(3)}$ y $\hat{\beta}_3^{(3)}$, son variables aleatorias. Si en esta expresión sustituimos el vector aleatorio —observable— y^3 por un vector concreto, obtendremos las estimaciones de los parámetros $\beta_0^{(3)}$, $\beta_1^{(3)}$, $\beta_2^{(3)}$, y $\beta_3^{(3)}$. Estas estimaciones las expresamos por: $\hat{\beta}_0^{*(3)}$, $\hat{\beta}_1^{*(3)}$, $\hat{\beta}_2^{*(3)}$ y $\hat{\beta}_3^{*(3)}$.

Finalmente el modelo estimado —en la tercera etapa— se expresa de la siguiente manera:

$$y^{*(3)} = \hat{\beta}_0^{*(3)} + \hat{\beta}_1^{*(3)}x_1 + \hat{\beta}_2^{*(3)}x_2 + \hat{\beta}_3^{*(3)}x_3$$

14. Cálculo de los siguientes indicadores:

- * residuos
- * residuos normalizados
- * residuos estudentizados
- * distancia de Dennis R. COOK

Para la i -ésima observación el residuo correspondiente —en la tercera etapa— viene dado mediante la siguiente expresión $e_i^{(3)}$:

Dado que, en esta etapa se aplican las mismas fórmulas que en la primera etapa, omitimos las fórmulas para el cálculo de los nuevos indicadores.

Si en esta etapa hubiese habido al menos un individuo cuya distancia de COOK es mayor que 1 habría que eliminarlo y reiniciar el proceso metodológico con un individuo menos.

15. Elegir como cuarta variable explicativa aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual estimada —en la tercera etapa— sea **máximo**.

	X_1	X_2	X_3	X_4	.	X_p
$e^{*(3)}$	$r_{e^{*(3)}, X_1}$	$r_{e^{*(3)}, X_2}$	$r_{e^{*(3)}, X_3}$	$r_{e^{*(3)}, X_4}$.	$r_{e^{*(3)}, X_p}$

16. Consideramos que la variable elegida ha sido la x_4 .

17. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada —en la tercera etapa— y la variable explicada elegida es —significativamente— diferente de cero.

Dado que, en esta primera etapa se aplican las mismas fórmulas que en la primera etapa, omitimos las fórmulas que nos permiten tomar la decisión de seguir rechazando la hipótesis nula.

El proceso de elección de variables se detiene dado que, aceptamos la hipótesis nula.

Así pues, la ecuación de regresión lineal estimada retenida, se expresa de la siguiente manera:

$$y^{*(3)} = \hat{\beta}_0^{*(3)} + \hat{\beta}_1^{*(3)}x_1 + \hat{\beta}_2^{*(3)}x_2 + \hat{\beta}_3^{*(3)}x_3$$

Consideraciones sobre el número de variables explicativas

Estudios realizados por FURNIVAL y WILSON (1971, 1974) recomiendan que, cuando el número de variables explicativas es superior a 40, es aconsejable utilizar la técnica de la **regresión en componentes principales** que a su vez, actúa contra las variables que están —significativamente— correlacionadas entre sí. Independientemente del número de variables explicativas LEBART, MORINEAU y PIRON (1995, pp. 233-237) recomiendan la realización de la regresión considerando, como variables explicativas, las componentes principales más significativas.

Consideraciones sobre la validez de los resultados de una regresión

Entre los dos criterios que **miden la calidad de una ecuación de regresión: 1, la desviación típica residual y 2, el coeficiente de determinación múltiple ajustado**, el segundo, puede conducir a errores de interpretación ya que, la ecuación que tiene el coeficiente de determinación múltiple más grande, no tiene —necesariamente— la varianza residual más débil. El valor más elevado del coeficiente puede ser debido, en efecto, a una varianza **más** grande de las variables explicadas.

Para evitar la situación de que la varianza residual estimada pudiera dar —en la práctica— una idea demasiado optimal de la calidad de la ecuación de regresión— cuando los mismos datos sirvan para establecer la ecuación y cifrar su previsión recomendamos, «técnicas basadas en la separación de los datos en dos o más conjuntos y en la validación cruzada». La solución más directa consiste en, repartir los datos en dos grupos: un grupo servirá para determinar el modelo y, el otro para apreciar la calidad del modelo, calculando —por ejemplo— el cuadrado medio del error de predicción, si el objetivo fuera el de definir la calidad predictiva del modelo. Esta validación es aceptada si el tamaño de la muestra es suficiente. SNEE (1977) considera que, el

tamaño debe ser superior a $2p+20$, siendo p el mayor gran número de coeficientes, susceptibles de ser introducidos en la ecuación.

Nota: el modelo es correcto si los residuos reducidos estimados se encuentran entre -2 y 2 tal como indican TOMASSONE y colaboradores (1992, p. 24).

Ejercicios destinados a ilustrar el proceso metodológico

Los dos ejercicios que tratamos, no constituyen más que, un soporte —práctico— destinado a ilustrar los principios expuestos.

Primer ejercicio

En este ejercicio aplicamos el proceso metodológico propuesto y observamos que, el test de FARRAR y GLAUBER conduce a resultados distintos cuando variamos ligeramente el nivel de significación.

Proceso preparatorio al procedimiento metodológico

1. Construcción de la tabla de datos originales

x_i	x_{i1}	x_{i2}	x_{i3}
15	1	2	3
31	2	5	6
37	3	6	7
49	4	7	10
57	5	9	11

2. Construcción de la matriz de correlaciones de BRAVAIS-PEARSON entre las variables explicativas.

	x_1	x_2	x_3
x_1	1	0,9774	0,9853
x_2	—	1	0,9751
x_3	—	—	1

3. Test de detección de una posible presunción de multicolinealidad.

Como resultado de la aplicación de la regla general de decisión del test de FARRAR y GLAUBER concluimos que, para:

a) un nivel de significación de 0,05

$$12,3944 < 12,592$$

y por tanto, **aceptamos la hipótesis nula**; es decir, **no hay presunción de multicolinealidad**.

b) un nivel de significación de 0,01

$$12,3944 > 10,645$$

y por tanto, **rechazamos la hipótesis nula**; es decir, **hay presunción de multicolinealidad**.

Fases del procedimiento metodológico

1. Elegir como primera variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal con la variable explicada sea el **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
y	0,9903	0,9893	0,9969

2. La variable elegida ha sido la x_3 .

3. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable explicada y la variable explicativa elegida, es —significativamente— diferente a cero.

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente,

$$H_0: \rho_{y,x_3} = 0$$

$$H_3: \rho_{y,x_3} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la regla general de decisión de dicho test concluimos que, como:

$$-3,182 > 21,9459 > 3,182$$

Para un nivel de significación de 0,05 **rechazamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, **el proceso de elección de variables continúa**.

4. El vector aleatorio $\hat{\beta}^{(1)}$ en nuestro caso concreto, está definido de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(1)} \\ \hat{\beta}_3^{(1)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 5 & 37 \\ 37 & 315 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 3 & 6 & 7 & 10 & 11 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ y_3^{(1)} \\ y_4^{(1)} \\ y_5^{(1)} \end{pmatrix}$$

Haciendo las operaciones de inversión y multiplicación de matrices deducimos fácilmente que,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(1)} \\ \hat{\beta}_3^{(1)} \end{pmatrix} = \frac{1}{206} \begin{pmatrix} 204 & 93 & 56 & -55 & -92 \\ -22 & -7 & -2 & 13 & 18 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ y_3^{(1)} \\ y_4^{(1)} \\ y_5^{(1)} \end{pmatrix}$$

Por consiguiente, la estimación de dicho vector se calcula sustituyendo el vector aleatorio —observable— $y^{(1)}$ por el vector realización.

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(1)} \\ \hat{\beta}_3^{*(1)} \end{pmatrix} = \frac{1}{206} \begin{pmatrix} 204 & 93 & 56 & -55 & -92 \\ -22 & -7 & -2 & 13 & 18 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 15 \\ 31 \\ 37 \\ 49 \\ 57 \end{pmatrix}$$

Llegando al resultado final:

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(1)} \\ \hat{\beta}_3^{*(1)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,3689 \\ 5,0583 \end{pmatrix}$$

De lo que se desprende que, la ecuación de regresión estimada, adopta la siguiente forma:

$$y^{*(1)} = 0,3689 + 5,0583 x_3$$

5. El cálculo de las estimaciones de los cuatro indicadores expresados —en la primera etapa— se refleja en la siguiente tabla:

y_i	Residuos estimados	Residuos normalizados estimados	Residuos estudentizados estimados	Distancia de COOK estimada
15	-0,5438	-0,3650	-0,6353	0,4095
31	0,2813	0,1888	0,2177	0,0078
37	1,2230	0,8208	0,9199	0,1084
49	-1,9519	-1,3100	-1,6427	0,7725
57	0,9898	0,6643	0,9534	0,4818

El hecho de que, no se detecte ninguna distancia de COOK superior a 1 nos indica que «**no hay ningún individuo atípico**» y, por consiguiente, no es necesario **reiniciar** el proceso metodológico.

6. Elegimos como segunda variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual estimada —en la primera etapa— sea **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
$e^{*(1)}$	0,1016	0,2172	0,0000

7. La variable elegida ha sido la x_2 .

8. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada —en la primera etapa— y la variable explicada elegida es —significativamente— diferente de cero.

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente:

$$H_0: \rho_{e^{*(1)}, x_2} = 0$$

$$H_1: \rho_{e^{*(1)}, x_2} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la regla general de decisión de dicho test concluimos que, como:

$$-3,182 < 0,3854 < 3,182$$

Para un nivel de significación de 0,05 **aceptamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, el **proceso de elección de variables se para**.

Así pues, el modelo estimado se expresa por,

$$y^{*(1)} = 0,3689 + 5,0583 x_3$$

Segundo ejercicio

En este ejercicio, aplicamos el proceso metodológico bajo dos situaciones.

Primera: consideramos —«a priori»— que, no hay ningún individuo atípico.

Segunda: consideramos que en el supuesto de existencia de atipicidad individual se **reiniciará** el proceso.

Primera situación: en este ejercicio, vamos a mostrar —tan sólo— el proceso metodológico, sin la inclusión de los tres tests de hipótesis, contenidos en el proceso

metodológico: test de FARRAR y GLAUBER, test de BREUSCH-GODFREY y test de JARQUE y BERA. El cálculo de la distancia de COOK, también la hemos omitido ya que, hemos considerado «a priori» que no hay ningún individuo atípico.

Proceso preparatorio al procedimiento metodológico

1. Construcción de la tabla de datos originales

y_i	x_{i1}	x_{i2}	x_{i3}
1	-3	5	-1
0	-2	0	1
0	-1	-3	1
1	0	-4	0
2	1	-3	-1
3	2	0	-1
3	3	5	1

2. Construcción de la matriz de correlaciones de BRAVAIS-PEARSON entre las variables explicativas.

	x_1	x_2	x_3
x_1	1	0	0
x_2	—	1	0
x_3	—	—	1

Fases del proceso metodológico

1. Elegir como primera variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal con la variable explicada sea el **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
y	0,8489	0,3501	-0,3930

2. La variable elegida ha sido la x_1 .

3. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable explicada y la variable explicativa elegida es —significativamente— diferente de cero.

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente.

$$H_0: \rho_{y, x_1} = 0$$

$$H_1: \rho_{y, x_1} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la **regla general de decisión** de dicho test concluimos que, como:

$$-2,015 > 3,5913 > 2,015$$

Para un nivel de significación del 0,1 **rechazamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, **el proceso de elección de variables continúa**.

4. El vector aleatorio $\hat{\beta}^{(1)}$, en nuestro caso concreto, está definido de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(1)} \\ \hat{\beta}_1^{(1)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 7 & 0 \\ 0 & 28 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1 & -3 \\ 1 & -2 \\ 1 & -1 \\ 1 & 0 \\ 1 & 1 \\ 1 & 2 \\ 1 & 3 \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ y_3^{(1)} \\ y_4^{(1)} \\ y_5^{(1)} \\ y_6^{(1)} \\ y_7^{(1)} \end{pmatrix}$$

Haciendo uso de las operaciones de inversión y de multiplicación de matrices deducimos fácilmente que,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(1)} \\ \hat{\beta}_1^{(1)} \end{pmatrix} = \frac{1}{7} \begin{pmatrix} 1 & -\frac{3}{4} \\ 1 & -\frac{2}{4} \\ 1 & -\frac{1}{4} \\ 1 & 0 \\ 1 & \frac{1}{4} \\ 1 & \frac{2}{4} \\ 1 & \frac{3}{4} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} y_1^{(1)} \\ y_2^{(1)} \\ y_3^{(1)} \\ y_4^{(1)} \\ y_5^{(1)} \\ y_6^{(1)} \\ y_7^{(1)} \end{pmatrix}$$

Por consiguiente, la estimación de dicho vector se calcula sustituyendo el vector aleatorio —observable— $y^{(1)}$ por el vector realización.

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(1)} \\ \hat{\beta}_1^{*(1)} \end{pmatrix} = \frac{1}{7} \begin{pmatrix} 1 & -\frac{3}{4} \\ 1 & -\frac{2}{4} \\ 1 & -\frac{1}{4} \\ 1 & 0 \\ 1 & \frac{1}{4} \\ 1 & \frac{2}{4} \\ 1 & \frac{3}{4} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 2 \\ 3 \\ 3 \end{pmatrix}$$

Llegando al resultado final,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(1)} \\ \hat{\beta}_1^{*(1)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1,4286 \\ 0,5000 \end{pmatrix}$$

De lo que se desprende que, la ecuación de regresión estimada —en la primera etapa— adopta la siguiente forma,

$$y^{*(1)} = 1,4286 + 0,5000 x_1$$

5. Cálculo del vector residuos estimado —en la primera etapa— mediante la ecuación de regresión.

$$e^{*(1)} = \begin{pmatrix} 1,0714 \\ -0,4286 \\ -0,9286 \\ -0,4286 \\ 0,0714 \\ 0,5714 \\ 0,0714 \end{pmatrix}$$

6. Elegir como segunda variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual estimada —en la primera etapa— sea **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
$e^{*(1)}$	0,0000	0,6623	-0,7406

7. La variable elegida ha sido x_3 .

8. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada —en la primera etapa— y la variable explicativa elegida es —significativamente— diferente de cero.

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente.

$$H_0: \rho_{e^{(1)}, x_3} = 0$$

$$H_1: \rho_{e^{(1)}, x_3} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la **regla general de decisión** de dicho test concluimos que, como:

$$-2,015 > 2,4645 > 2,015$$

Para un nivel de significación del 0,1 **rechazamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, **el proceso de elección de variables continúa**.

9. El vector aleatorio $\hat{\beta}^{(2)}$, en este caso concreto, está definido de la siguiente manera,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(2)} \\ \hat{\beta}_1^{(2)} \\ \hat{\beta}_3^{(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 7 & 0 & 0 \\ 0 & 28 & 0 \\ 0 & 0 & 6 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1 & -3 & -1 \\ 1 & -2 & 1 \\ 1 & -1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 \\ 1 & 2 & -1 \\ 1 & 3 & 1 \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} y_1^{(2)} \\ y_1^{(2)} \\ y_2^{(2)} \\ y_3^{(2)} \\ y_4^{(2)} \\ y_5^{(2)} \\ y_6^{(2)} \\ y_7^{(2)} \end{pmatrix}$$

Haciendo uso de las operaciones de inversión y de multiplicación de matrices deducimos fácilmente que,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(2)} \\ \hat{\beta}_1^{(2)} \\ \hat{\beta}_3^{(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{7} & -\frac{3}{28} & -\frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & -\frac{2}{28} & \frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & -\frac{1}{28} & \frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & 0 & 0 \\ \frac{1}{7} & \frac{1}{28} & -\frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & \frac{2}{28} & -\frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & \frac{3}{28} & \frac{1}{6} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} y_1^{(2)} \\ y_2^{(2)} \\ y_3^{(2)} \\ y_4^{(2)} \\ y_5^{(2)} \\ y_6^{(2)} \\ y_7^{(2)} \end{pmatrix}$$

Por consiguiente, la estimación de dicho vector se calcula sustituyendo el vector aleatorio —observable— $y^{(2)}$ por el vector realización.

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(2)} \\ \hat{\beta}_1^{*(2)} \\ \hat{\beta}_3^{*(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{7} & -\frac{3}{28} & -\frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & -\frac{2}{28} & \frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & -\frac{1}{28} & \frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & 0 & 0 \\ \frac{1}{7} & \frac{1}{28} & -\frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & \frac{2}{28} & -\frac{1}{6} \\ \frac{1}{7} & \frac{3}{28} & \frac{1}{6} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 2 \\ 3 \\ 3 \end{pmatrix}$$

llegando el resultado final,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(2)} \\ \hat{\beta}_1^{*(2)} \\ \hat{\beta}_3^{*(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1,4286 \\ 0,5000 \\ -0,5000 \end{pmatrix}$$

De lo que se desprende que, la ecuación de regresión estimada —en la segunda etapa— adopta la siguiente forma.

$$y^{*(2)} = 1,4286 + 0,5000 x_1 - 0,5000 x_3$$

10. Cálculo del vector residuo estimado —en la segunda etapa— mediante la ecuación de regresión.

$$e^{*(2)} = \begin{pmatrix} 0,5714 \\ 0,0714 \\ -0,4286 \\ -0,4286 \\ -0,4286 \\ 0,0714 \\ 0,5714 \end{pmatrix}$$

11. Elegir como tercera variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual —en la segunda etapa— sea **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
$e^{*(2)}$	0,0000	0,9901	0,0000

12. La variable elegida ha sido la x_2

13. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada —en la segunda etapa— y la variable explicativa elegida es —significativamente— diferente de cero.

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente:

$$H_0: \rho_{e^{*(2)}, x_2} = 0$$

$$H_1: \rho_{e^{*(2)}, x_2} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la **regla general de decisión** de dicho test concluimos que, como:

$$-2,015 > 15,6926 < 2,015$$

Para un nivel de significación del 0,1 **rechazamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, **el proceso de elección de variables continúa**.

14. El vector aleatorio $\hat{\beta}^{(3)}$, en nuestro caso concreto, está definido por la siguiente manera.

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(3)} \\ \hat{\beta}_1^{(3)} \\ \hat{\beta}_3^{(3)} \\ \hat{\beta}_2^{(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 7 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 28 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 6 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 84 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1 & -3 & -1 & 5 \\ 1 & -2 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 1 & -3 \\ 1 & 0 & 0 & -4 \\ 1 & 1 & -1 & -3 \\ 1 & 2 & -1 & 0 \\ 1 & 3 & 1 & 5 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} y_1^{(3)} \\ y_2^{(3)} \\ y_3^{(3)} \\ y_4^{(3)} \\ y_5^{(3)} \\ y_6^{(3)} \\ y_7^{(3)} \end{pmatrix}$$

haciendo uso de las operaciones de inversión y de multiplicación de matrices deducimos fácilmente que,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{(3)} \\ \hat{\beta}_1^{(3)} \\ \hat{\beta}_3^{(3)} \\ \hat{\beta}_2^{(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{7} & -\frac{3}{28} & -\frac{1}{6} & \frac{5}{84} \\ \frac{1}{7} & -\frac{2}{28} & \frac{1}{6} & 0 \\ \frac{1}{7} & -\frac{1}{28} & \frac{1}{6} & -\frac{3}{84} \\ \frac{1}{7} & 0 & 0 & -\frac{4}{84} \\ \frac{1}{7} & \frac{1}{28} & -\frac{1}{6} & -\frac{3}{84} \\ \frac{1}{7} & \frac{2}{28} & -\frac{1}{6} & 0 \\ \frac{1}{7} & \frac{3}{28} & \frac{1}{6} & \frac{5}{84} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} y_1^{(3)} \\ y_2^{(3)} \\ y_3^{(3)} \\ y_4^{(3)} \\ y_5^{(3)} \\ y_6^{(3)} \\ y_7^{(3)} \end{pmatrix}$$

Por consiguiente, la estimación de dicho vector se calcula sustituyendo el vector aleatorio —observable— $y^{(3)}$ por el vector realización.

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(3)} \\ \hat{\beta}_1^{*(3)} \\ \hat{\beta}_3^{*(3)} \\ \hat{\beta}_2^{*(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{7} & -\frac{3}{28} & -\frac{1}{6} & \frac{5}{84} \\ \frac{1}{7} & -\frac{2}{28} & \frac{1}{6} & 0 \\ \frac{1}{7} & -\frac{1}{28} & \frac{1}{6} & -\frac{3}{84} \\ \frac{1}{7} & 0 & 0 & -\frac{4}{84} \\ \frac{1}{7} & \frac{1}{28} & -\frac{1}{6} & -\frac{3}{84} \\ \frac{1}{7} & \frac{2}{28} & -\frac{1}{6} & 0 \\ \frac{1}{7} & \frac{3}{28} & \frac{1}{6} & \frac{5}{84} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 2 \\ 3 \\ 3 \end{pmatrix}$$

llegando al resultado final,

$$\begin{pmatrix} \hat{\beta}_0^{*(3)} \\ \hat{\beta}_1^{*(3)} \\ \hat{\beta}_3^{*(3)} \\ \hat{\beta}_2^{*(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1,4286 \\ 0,5000 \\ -0,5000 \\ 0,1190 \end{pmatrix}$$

de lo que se desprende que, la ecuación de regresión estimada —en la tercera etapa— adopta la siguiente forma,

$$y^{*(3)} = 1,4286 + 0,5000 x_1 - 0,5000 x_3 + 0,1190 x_2$$

El vector residuo estimado —en la tercera etapa— mediante la ecuación de regresión es:

$$e^{*(3)} = \begin{pmatrix} -0,0236 \\ 0,0714 \\ -0,0716 \\ 0,0474 \\ -0,0716 \\ 0,0714 \\ -0,0236 \end{pmatrix}$$

Comentario

La entrada progresiva de las variables en la ecuación de regresión, es función del nivel de significación. De tal manera que, cuando el nivel de significación aumenta, es posible la entrada de más variables. en concreto, cuando:

- el nivel de significación es 0,01 no entra ninguna variable.
- el nivel de significación es 0,05 entra la x_1 .
- el nivel de significación es 0,1 entran las tres en el siguiente orden: 1º x_1 , 2º x_3 y 3º x_2 .

Segunda situación: consideramos que hay individuos atípicos y, por consiguiente, **reiniciaremos el proceso metodológico.**

Proceso preparatorio al proceso metodológico

Omitimos este proceso ya que es el mismo que en la **primera situación.**

Fases de proceso metodológico

Omitimos las cuatro primeras fases ya que son las mismas que en la **primera situación**.

1. La ecuación de regresión estimada —en la primera etapa— adopta la siguiente forma:

$$y^{(1)} = 1,4286 + 0,5000 x_1$$

2. El cálculo de las estimaciones de los cuatro indicadores expresados —en la primera etapa— se refleja en la siguiente tabla.

y_i	Residuos estimados	Residuos normalizados estimados	Residuos estudentizados estimados	Distancia de COOK estimada
1	1,0714	1,4541	1,9887	1,7104*
0	-0,4286	-0,5817	-0,6883	0,0948
0	-0,9286	-1,2603	-1,3905	0,2102
1	-0,4286	-0,5817	-0,6283	0,0329
2	0,0714	0,0969	0,1110	0,0013
3	0,5714	0,7755	0,9176	0,1684
3	0,0714	0,0969	0,1324	0,0076

Teniendo en cuenta el criterio adoptado sobre la distancia de COOK, eliminamos el primer individuo.

Reinicialización del proceso metodológico

3. Construcción de la nueva matriz de datos

y_i	x_{i1}	x_{i2}	x_{i3}
0	-2	0	1
0	-1	-3	1
1	0	-4	0
2	1	-3	-1
3	2	0	-1
3	3	5	1

4. Construcción de la matriz de correlaciones de BRAVAIS-PEARSON entre las variables explicativas.

	x_1	x_2	x_3
x_1	1,0000	0,5649	-0,3806
x_2	—	1,0000	0,3583
x_3	—	—	1,0000

Fase del procedimiento metodológico

1. Elegir como primera variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal con la variable explicada sea el **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
y	0,9695	0,5477	-0,5165

2. La variable elegida ha sido la x_1

3. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable explicada y la variable explicativa elegida es —significativamente— diferente de cero

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente:

$$H_0: \rho_{y,x_1} = 0$$

$$H_1: \rho_{y,x_1} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la regla general de decisión de dicho test concluimos que, como:

$$-2,132 > 7,9113 > 2,132$$

Para un nivel de significación del 0,1 **rechazamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, **el proceso de elección de variables continúa**.

4. La ecuación de regresión estimada —en la primera etapa— adopta la siguiente forma:

$$y^{(1)} = 1,1429 + 0,7143 x_1$$

5. El cálculo de las estimaciones de los cuatro indicadores expresados —en la primera etapa— se refleja en la siguiente tabla.

y_i	Residuos estimados	Residuos normalizados estimados	Residuos estudentizados estimados	Distancia de COOK estimada
0	0,2857	0,7559	1,0443	0,5998
0	-0,4286	-1,1340	-1,3506	0,3821
1	-0,1429	-0,3781	-0,4177	0,0193
2	0,1428	0,3778	0,4174	0,0192
3	0,4285	1,1337	1,3502	0,3819
3	-0,2858	-0,7562	-1,0956	0,6602

Teniendo en cuenta el criterio aportado por la distancia de COOK, no eliminamos ningún individuo y, por consiguiente seguimos el proceso metodológico.

6. Elegimos como segunda variable explicativa, aquella cuyo coeficiente de correlación lineal de BRAVAIS-PEARSON con la variable residual estimada —en la primera etapa— sea **máximo**.

	x_1	x_2	x_3
$e^{(1)}$	-0,0001	0,0000	-0,6017

7. La variable elegida ha sido la x_3 .

8. Contrastar, si el coeficiente de correlación poblacional entre la variable residual estimada —en la primera etapa— y la variable explicativa elegida es —significativamente— diferente a cero.

El test de hipótesis que hay que realizar es el siguiente,

$$H_0: \rho_{e^{(1)}, x_3} = 0$$

$$H_3: \rho_{e^{(1)}, x_3} \neq 0$$

Como resultado de la aplicación de la **regla general de decisión** de dicho test concluimos que, como:

$$-2,132 < 1,5067 < 2,132$$

Para un nivel de significación del 0,1 **aceptamos la hipótesis nula** y, por consiguiente, **el proceso de elección de variables se para**.

Por lo tanto, la ecuación de regresión estimada es,

$$y^{(1)} = 1,1429 + 0,7143 x_1$$

Comentarios

El hecho de que, hayamos **reiniciado** el proceso de elección de variables por la eliminación de individuos atípicos, nos conduce a un resultado de interés, en cuanto a las variables retenidas en la estimación de la ecuación de regresión. En lugar de haber retenido tres variables: x_1 , x_2 y x_3 , hemos retenido una variable: x_1 . Aunque, sin duda alguna, con las tres variables obtenemos una **varianza residual** menor que con una, sin embargo, consideraremos el caso de una ya que, **esta nos aporta resultados satisfactorios, en cuanto a la estimación se refiere.**

«La estimación de la varianza residual con una variable habiendo eliminado individuos atípicos es al menos dos veces menor que, la estimación de la varianza residual con dos variables, sin haber eliminado individuos atípicos».

BIBLIOGRAFÍA

- (1) AGERSON T., DENIS J. B., FOU-CART T., JOLIVET E., PRUVOT F., ROUX M., TOMASSONE R. (1991). STAT-ITCF versión 4.0 Institut Technique des Céréales et des Fourrages. 8 avenue du Président Wilson 75116 Paris.
- (2) AUGRAIN S.- LESQUOY-de-TURCKHEIM, MILLIER C., TOMASSONE R. (1992). La Régression nouveaux regards sur une ancienne méthode statistique. Masson. 2^a édition révisée.
- (3) BAILLARGEON G. (1985). Méthodes Statistiques. Méthodes d'analyse de régression linéaire simple et régression multiple avec applications dans différents secteurs de l'entreprise. Volume 2. Les éditions SMG.
- (4) BERA A. K., JARQUE C. M. (1980). Efficient test for normality, homoskedasticity and serial independence of regression residual. *Econometrics Letters*, 6, 225-259.
- (5) BERA A. K., JARQUE C. M. (1984). Testing the normality assumption in limited dependent variable model. *International Economic Review*, vol. 25, n° 3.
- (6) BOURBONNAIS R. (1998). *Econometrie*. 2^a édition. Dunod.
- (7) BOURBONNAIS R., USUNIER J-CL. (1992). *Pratique de la prévision des ventes*. Conception de Systèmes. Ed. Economica. 49, rue Héricat, 75017 Paris.
- (8) BREUSCH T. (1978). Testing for autocorrelation in dynamic linear models. *Australian Economic Papers*, vol. 17.
- (9) CAMPOS SÁNCHEZ L., DIAZ-LLANOS Y SAINZ-CALLEJA Fco. J. (1997) *Procedimientos de gestión informática utilizando el STATlab y sus aplicaciones en la Estadística Exploratoria Multidimensional*. Oficina provincial del registro de la propiedad intelectual. Madrid. Solicitud número 63. 787.
- (10) CAZES P. (1975). Protection de la régression par utilisation de contraintes linéaires et non linéaires. *Rev. Stat. Appl.* 23, 37-57.
- (11) CAZES P. (1978). Méthodes de régression: la régression sous contraintes. *Cah. Anal. Données* 3, 147-165.
- (12) COOK R. D. (1997). Detection of influential observations in linear regression. *Technometrics* 19, 15-18.
- (13) COOK R. D., WEISBERG S. (1982). *Residuals and influence in regression*. Chapman et Hall, New York, 230 p.

- (14) DAGNELIE P. (1977). Analyse statistique à plusieurs variables. Les Presses Agronomiques de Gembloux.
- (15) DRAPER N. R., SMITH H. (1981). Applied regression analysis. Second Edition. John Wiley & Sons.
- (16) DROESBEKE J-J. (1988). Elements de Statistique. Editions de l'Université de Bruxelles.
- (17) DURBIN J., WATSON G. S. (1950). Testing for serial correlation in least-squares regression. *Biometrika*, vol 37.
- (18) DURBIN J. WATSON G. S. (1951). Testing for serial correlation in least-squares regression. *Biometrika*, vol 38.
- (19) FARRAR D. E., GLAUBER R. R. (1967). Multicollinearity in regression analysis. *Review of Economics and Statistics*, vol 49.
- (20) FURNIVAL G. M. (1971). All possible regressions with les computation. *Technometrics*, 13, p 403-408.
- (21) FURNIVAL G. M., WILSON R. W. (1974). Regression by leaps and bounds. *Technometrics*, 16, p 403-511.
- (22) GODFREY L. G. (1978). Testing for higher order serial correlation in regression equation when the regressors contain lagged dependant variables. *Econometrica*, vol. 46.
- (23) LEBART L., MORINEAU A., PIRON M. (1995). Statistique exploratoire multidimensionnelle. Dunod.
- (24) LUND I. A. (1971). An application of stagewise and strepwise regression procedure to a problem of stimating precipitation in California. *J. Appl. Meteorol.*, 10, 892-902.
- (25) MAHALANOBIS P. C. (1936). On the generalized distance in statistics. *Proc. Nat. Inst. Sci. India*, 12, p 49-55.
- (26) MONTGOMERY D. C., RUNGER G. C. (1996). Probabilidad y Estadística aplicadas a la Ingeniería. McGRAW-HILL Interamericana editores, S.A.
- (27) PALM R. (1994) La régression: un problème complexe à partir d'une idée simple. *Biom. Praxim*, 34, 109-123.
- (28) PALM R., IEMMA A. F. (1995). Quelques alternatives à la regression classique dans le cas de la colinéarité. *Revue. Statist. Appl.*, 43 (2), p 5-23.
- (29) SNEE R. D. (1977). Validarion of regression models: methods and examples. *Technometrics* 19, 415-428.
- (30) WEISBERG S. (1985). Applied linear regression. New York, Wiley, 324.

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

1. **PRESENTACIÓN:** De cada trabajo se enviará a la Real Academia de Doctores un texto original con una extensión de entre quince y veinticinco folios en Din A-4 a un espacio y medio. Se acompañará de un disquete de ordenador correspondiente al texto.
2. **BIBLIOGRAFÍA:** Las citas bibliográficas irán al final del original, correlativamente numeradas, por orden de aparición en el texto.
3. **PRUEBAS:** Deberán devolverse debidamente corregidas, en un plazo máximo de ocho días a partir de la fecha de envío.
4. **SEPARATAS:** Cada autor recibirá 30 separatas de su artículo.

Para cualquier aclaración pueden dirigirse a la encargada de publicaciones Ángela García en el teléfono 91 532 00 69, fax 91 531 95 22, correo electrónico rad@radoctores.es

